Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр
им. В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

НАСРЕДИНОВ
Артём Сергеевич

Тканевая инженерия кровеносных сосудов малого калибра на основе децеллюляризованной артерии пуповины человека

14.01.26 – сердечно-сосудистая хирургия
03.03.04 – клеточная биология, цитология и гистология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:
д.м.н., проф. Вавилов Валерий Николаевич
д.м.н. Анисимов Сергей Владимирович

Санкт-Петербург - 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АП – артерии пуповины

ВКМ - внеклеточный матрикс

ГМК – гладкомышечные клетки

ДАП - децеллюляризованные артерии пуповины

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДНКаза - дезоксирибонуклеаза

ИГХ - иммуногистохимия

МСК - мезенхимные стволовые клетки

МСК ЖТ - МСК жировой ткани

МСК КМ - МСК костного мозга

РНК - рибонуклеиновая кислота

РНКаза - рибонуклеаза

ПГК - полигликолевая кислота

ТИКС - тканеинженерный кровеносный сосуд

ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» - Федеральное государственное бюджетное учреждение «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова»

ФСБ - фосфатно-солевой буферный раствор

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

ЭПК - эндотелиальные прогениторные клетки

α-SMA - альфа-гладкомышечный актин

HUVEC - эндотелиальные клетки пупочной вены человека

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Заболевания сердечно-сосудистой системы являются основной причиной смертности во всем мире (World Health Organization, World health statistics 2013). «Золотым стандартом» лечения заболеваний, вызванных окклюзией сосудов, являются шунтирующие операции. Лучшим материалом для шунтов принято считать аутологичные вены и артерии. Однако они не всегда доступны из-за различного ряда наблюдаемых в них изменений или из-за того, что они уже были использованы во время предыдущих операций. Это обуславливает высокую потребность в получении сосудистых протезов малого диаметра, которые по основным характеристикам не отличались бы от аутошунтов (Kakisis J.D. et al., 2005; Campbell G.R., Campbell J.H., 2007; Seifu D.G. et al., 2013). Так, только в ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» в 2013 году при выполнении более 1600 операций аорто-коронарного обхода, в среднем было наложено 3-4 шунта (Карпенко М.А., Стрижак И.Г., 2013). Таким образом, потребность в последних для такого кардиохирургического центра составляет более 5 тысяч в год.

Создание искусственного сосудистого кондуита с проходимостью, подобной той, что наблюдается при использовании нативных вен или артерий, по мнению некоторых авторов - утопия (Conte M.S., 1998; Kakisis J.D. et al., 2005; Naito Y. et al, 2011, 2014).

Однако, тканевая инженерия - новая междисциплинарная область науки, занимающаяся разработкой биологических заменителей, для восстановления, сохранения и улучшения функции тканей или целого органа - уже сегодня опровергает эту точку зрения (McIntire L.V., 2003; Peck M. et al., 2011; Seifu D.G. et al., 2013). Благодаря исследованиям в этом направлении, к настоящему времени предложены варианты «изготовления» сосудов, которые приближаются по своим характеристикам к естественным их заменителям (Nerem R.M., Seliktar D., 2001; Baguneid M.S., 2006; Quint C. et al., 2011).

К «искусственным» артериям, создаваемым методами тканевой инженерии, предъявляют все требования, которые формулируют, когда говорят о естественных кровеносных сосудах. Эти вновь изготовленные артерии или вены должны:

- быть биосовместимыми и биостабильными;
- быть тромборезистентностными;
- быть устойчивыми к инфекции;
- обладать нулевой хирургической порозностью;
- иметь оптимальные механические свойства (прочность, эластичность, гибкость);

- быть вазоактивными (L'Heureux, N. et al., 1993, 1998, 2007; Dahl, S.L.M., 2003, 2011; Campbell G.R., Campbell J.H., 2007; Naito Y. et al, 2011, 2014). Они должны хорошо «приживать» в организме реципиента и заселяться его клетками, становясь фактически собственным сосудом. К настоящему времени ни один из разработанных заменителей сосудов не обладает этими качествами в полной мере (Nemeno-Guanzon J.G., 2012; Naito Y. et al, 2011, 2014).

Следует отметить, что во всем мире тканевая инженерия различных органов и тканей, в том числе и кровеносных сосудов активно развивается уже более 10 лет, открываются новые центры и лаборатории, ведутся научные поиски подходящих материалов для изготовления носителей клеток, изучают различные клеточные субстраты, сообщают о все новых достижениях тканевой инженерии, в то же время в России это направление только начинает свое развитие. Так, на I конгрессе по регенеративной медицине, прошедшем в декабре 2013 г. в Москве, среди более чем 280 докладов только 5 были посвящены тканевой инженерии кровеносных сосудов, при этом 3 из них были представлены нашей исследовательской группой. Таким образом, настоящая работа актуальна и является одним из первых российских исследований в этой области.

Цель и задачи исследования

Цель настоящего исследования, используя методы тканевой инженерии, разработать способ создания кровеносного сосуда диаметром 3-4 мм из децеллюляризованной артерии пуповины человека, который по своим морфологическим и механическим свойствам был бы идентичен нативной артерии. Оценить эти свойства на экспериментальной модели.

В задачи исследования входило:

1. Разработка эффективной методики децеллюляризации артерий пуповины человека, оценка структуры, антигенного потенциала и механических свойств внеклеточного матрикса децеллюляризованных артерий пуповины.
2. Определение возможности длительного хранения децеллюляризованных артерий пуповины для создания «банка» сосудистых заменителей с целью сокращения временных и финансовых затрат на получение готового к использованию тканеинженерного кровеносного сосуда.
3. Разработка технологии заселения децеллюляризованных артерий пуповины жизнеспособными стволовыми клетками *in vitro*, оценка их пролиферативной активности.
4. Оценка морфофункциональных свойств полученных тканеинженерных кровеносных сосудов *in vivo* в эксперименте на мелких лабораторных животных.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Артерии пуповины могут быть использованы в качестве основы для создания тканеинженерного кровеносного сосуда.
2. Разработанный способ децеллюляризации артерий пуповины эффективно удаляет клетки и клеточный дебрис, оставляя внеклеточный матрикс артерии интактным.
3. Механические свойства нативных артерий сохраняются после децеллюляризации. Децеллюляризованные артерии пуповины могут длительное время (до 10 мес.) хранится без изменения своих механических свойств.
4. Использование проточного биореактора улучшает результаты рецеллюляризации артерий пуповины, лишенных клеточного состава.
5. Рецеллюляризация артерий пуповины по разработанной методике позволяет получить кровеносный сосуд, свойства которого близки естественному.
6. Высокая проходимость этих сосудов подтверждена в эксперименте.

Научная новизна работы

Разработан оригинальный способ децеллюляризации артерий пуповины человека комбинированным детергентно-ферментным способом, патент РФ на изобретение №2504334.

Впервые проведена комплексная оценка морфологических и механических свойств артерий пуповины, децеллюляризация которых проведена оригинальным способом.

Определена оптимальная плотность посева на децеллюляризованные артерии пуповины мезенхимных стволовых клеток (МСК) и необходимая длительность их культивирования *in vitro* в проточном биореакторе оригинальной конструкции.

Показана возможность создания тканеинженерного кровеносного сосуда на основе децеллюляризованной артерии пуповины, заселенных МСК.

Оценена проходимость полученных тканеинженерных кровеносных сосудов в экспериментах *in vivo.*

Получены сведения о появлении в тканеинженерном сосуде *in vivo* дифференцированных клеток нормальной сосудистой стенки: эндотелиоцитов и миоцитов.

Теоретическое и практическое значение работы

Доказана возможность эффективной децеллюляризации артерий пуповины человека. Разработана новая методика децеллюляризации артерий пуповины. Создан оригинальный биореактор для успешного посева МСК на матрицу децеллюляризованной артерии пуповины. Получен сосуд, который может быть использован в продолжении экспериментальной работы в ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» и других лабораториях. Можно и необходимо

исследовать возможность использования изготовленного сосуда в клинической практике.

Апробация работы

По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК для публикации основных результатов диссертаций, и 6 тезисов докладов. Получен 1 патент РФ на изобретение. Материалы диссертации были представлены на XIX Всероссийском съезде сердечно-сосудистых хирургов (Москва, 2013), на I Национальном Конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2013), на VII Всероссийском съезде трансплантологов (Москва, 2014) и на собраниях проблемных комиссий института сердечно-сосудистой хирургии и института молекулярной биологии и генетики ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова». По теме научно-исследовательской работы диссертант стал победителем конкурса на соискание именной стипендии ОАО «Сбербанк России» и «Фонда Алмазова» (2013), проходил стажировку в г. Лейпциге (Германия).

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Насрединов А.С., Лаврешин А.В., Анисимов С.В., Вавилов В.Н., Курапеев Д.И. Децеллюляризованные артерии пуповины человека как основа тканеинженерных кровеносных сосудов малого калибра // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. - 2013. – Т. VIII. - № 1. – С. 66-71.**
2. **Насрединов А.С., Лаврешин А.В. Тканевая инженерия кровеносных сосудов: способы совмещения клеток и носителя // Гены & Клетки (бывш. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия). - 2014. – Т. IX. - № 1. – С. 23-34.**
3. **Лаврешин А.В., Насрединов А.С., Курапеев Д.И., Анисимов С.В., Митрофанова Л.Б., Бещук О.В. Децеллюляризация аортальных гомографтов и их морфологическая оценка // Гены & Клетки (бывш. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия). - 2014. – Т. IX. - № 1. – С. 64-71.**
4. **Насрединов А.С., Лаврешин А.В., Лебедева Е.А., Анисимов С.В., Вавилов В.Н., Курапеев Д.И. Артерии пуповины человека сохраняют свои механические свойства после децеллюляризации// Гены & Клетки (бывш. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия). -2014. – Т. IX. - № 2. – С. 80 – 86.**
5. **Насрединов А.С., Анисимов С.В., Вавилов В.Н., Пузанов М.В., Курапеев Д.И. Рецеллюляризация тканеинженерных сосудов в проточном биореакторе // Цитология. – 2014. – Т. 56. - № 12. – С. 926-932.**

6. **Насрединов А.С.** Способ децеллюляризации кровеносных сосудов малого калибра. Патент РФ на изобретение №2504334, приоритет изобр. 28.11.12. Зарегистрирован в гос. реестре изобр. РФ 20.01.14 г.
7. **Насрединов А. С.,** Лаврешин А. В., Анисимов С. В., Вавилов В. Н., Курапеев Д. И. Способ получения экстрацеллюлярных матриксов кровеносных сосудов малого калибра методом децеллюляризации и их морфологическая оценка // Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. – 2013. – Т. 14. - № 6. - Приложение «Сборник докладов и сообщений 19 Всероссийского съезда сердечно-сосудистых хирургов, Москва, 24-27 ноября 2013г.». - С. 250
8. **Насрединов А.С.,** Анисимов С.В., Вавилов В.Н., Курапеев Д.И., Лебедева Е.А. Оценка механических свойств децеллюляризованных артерий пуповины человека // Материалы I Национального Конгресса по регенеративной медицине. - М.: «Меди Экспо», 2013. – С. 181.
9. **Насрединов А.С.,** Лаврешин А.В., Анисимов С.В., Вавилов В.Н., Курапеев Д.И. Рецеллюляризация сосудистого кондуита мезенхимными стволовыми клетками // Материалы I Национального Конгресса по регенеративной медицине. - М.: «Меди Экспо», 2013. – С. 182.
10. **Насрединов А.С**., Лаврешин А.В., Анисимов С.В., Вавилов В.Н., Курапеев Д.И. Способ получения внеклеточных матриксов артерий малого калибра и их морфологическая оценка // Материалы I Национального Конгресса по регенеративной медицине. - М.: «Меди Экспо», 2013. – С. 183.
11. **Насрединов А.С**., Лаврешин А.В., Анисимов С.В., Вавилов В.Н., Курапеев Д.И. Биоинженерный кровеносный сосуд малого калибра на основе артерии пуповины человека // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2014. – Т. XVI. – Приложение «Материалы VII Всероссийского съезда трансплантологов, Москва, 28-30 мая 2014г.». – С. 282.
12. **Насрединов А.С.**, Лаврешин А.В., Анисимов С.В., Вавилов В.Н., Курапеев Д.И. Использование проточного биореактора улучшает результаты рецеллюляризации биоинженерных сосудистых кондуитов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2014. – Т. XVI. – Приложение «Материалы VII Всероссийского съезда трансплантологов, Москва, 28-30 мая 2014г.». – С. 251.

Личный вклад автора

Тема и план диссертации, её основные идеи и содержание разработаны совместно с научными руководителями.

Автором изучена литература в данной области науки, в том числе на иностранном языке.

Самостоятельно обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель, задачи и этапы научного исследования и проведения экспериментов.

Диссертант самостоятельно выделял артерии из пуповин, лично отрабатывал различные способы децеллюляризации, проводил их сравнительный анализ. Оригинальный способ децеллюляризации артерий пуповины разработан автором.

Механические испытания нативных и децеллюляризованных артерий пуповины проводились автором совместно с сотрудником СПбГЭТУ «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина) Лебедевой Е.А.

Диссертант получал и культивировал МСК, проводил эксперименты по их заселению на децеллюляризованные артерии пуповины.

Автором разработана конструкция биореактора и способ рецеллюляризации.

Автор проводил эксперименты по имплантации исследуемых сосудов лабораторным животным. Наблюдение и уход за животными осуществлялся совместно с сотрудниками вивария. Выведение животных из эксперимента и забор сосуда проводился автором.

Гистологические препараты изготавливались лаборантами отделения патоморфологии ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России. Иммуногистохимические препараты изготовляла научный сотрудник НИЛ патоморфологии Бещук О.В. Анализ препаратов проводил диссертант совместно с заведующей НИЛ патоморфологии д.м.н. Митрофановой Л.Б.

Сбор, обобщение, анализ, обработка результатов и написание диссертации выполнены автором.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Введение

Сердечно-сосудистые заболевания являются ведущей причиной смертности во всем мире (World Health Organization, 2013). Вместе с тем, сердечно-сосудистая хирургия – одна из самых быстро и успешно прогрессирующих областей медицины, и своевременно выполненные операции у больных с заболеваниями сердца и сосудов не только предотвращают инвалидизацию многих тысяч больных, но и влияют на уровень смертности. (Бокерия Л.А. и др., 2004). «Золотым стандартом» лечения сердечно-сосудистых заболеваний, обусловленных окклюзией сосудов являются шунтирующие операции.

Поиск подходящего материала для создания протеза кровеносного сосуда начался одновременно с зарождением сердечно-сосудистой хирургии. Аутовенозные шунты хорошо себя зарекомендовали в реконструктивных сосудистых операциях, но они не всегда доступны: либо вследствие их варикозной трансформации, либо в результате их удаления во время флебэктомий или предыдущих шунтирующих операций.. К тому же в кардиохирургии они уже не отвечают современным требованиям из-за относительно низкой отдаленной проходимости, но и альтернативы им нет (Athanasiou T. et al, 2011).

Использование собственных артерий пациента наиболее предпочтительно с точки зрения их механических характеристик и морфологических свойств, идентичных по отношению к шунтируемым сосудам, а также отдаленных результатов операций. Лучшим кондуитом в кардиохирургии является внутренняя грудная артерия, а в качестве другого варианта артериального шунта часто применяют лучевую артерию (Гордеев М.Л., 2001; Бокерия Л.А. и др., 2004; Athanasiou T. et al, 2011). Результаты проспективных наблюдений свидетельствуют о том, что пятилетняя проходимость аутоартериальных шунтов составляет 90 % и более, что значительно превышает проходимость венозных кондуитов (Possati G. et al, 2003; Athanasiou T. et al., 2011). Однако, использование аутоартериальных сосудов имеет свои недостатки, - например их ограниченное количество и длина, снижение кровообращения в донорской зоне, - что может привести к острой ишемии или нарушению заживления послеоперационной раны (Sadaba J.R. et al., 2001). Кроме того, выделение и подготовка аутовенозных и аутоартериальных трансплантатов увеличивает продолжительность операции и наносит дополнительную травму, что кроме прочего может привести и к неврологическим осложнениям (Shah S.A. et al, 2007).

Синтетические протезы из таких недеградируемых полимеров как экспандированный политетрафторэтилен (эПТФЭ, Тефлон, *GoreTex*) и полиэтилентерефталат (Дакрон, Лавсан) хорошо зарекомендовали себя при протезировании средних и крупных сосудов, то есть сосудов диаметром более 6 мм, где линейная скорость потока высокая, а периферическое сопротивление

низкое. Однако при меньшем диаметре заменяемых артерий результаты операций остаются неудовлетворительными вследствие развития гиперплазии интимы в области анастомозов и тромбоза шунта (Sapsford R.N. et al., 1981; Veith F.J. et al., 1986; Klinkert P. et al., 2004; Курьянов П.С., 2009). Кроме того, такие протезы не имеют эндотелия, не растут, не регенерируют, а их использование связано с повышенным риском инфицирования по сравнению с нативными сосудами.

Прошло более 3 десятков лет с тех пор, как M. Herring et al. (1978) впервые описали одноэтапную технику заселения сосудистых протезов эндотелиальными клетками (Herring M. et al., 1978). Эндотелиоциты снимали скальпелем с внутренней стенки подкожной вены и переносили на внутреннюю поверхность сосудистого протеза из дакрона. Уже тогда было показано, что для улучшения отдаленных результатов реконструктивных операций необходимы функционально активные клетки, обладающие антитромбогенными свойствами (Herring M. et al., 1979). В последующем были исследованы различные способы получения «эндотелизированных» протезов на основе синтетических недеградируемых материалов, но по-настоящему успешных методик разработано не было. Например, было показано, что через 24 ч после имплантации протеза 95% эндотелиальных клеток, совмещенных с ПТФЭ протезом, смывались потоком крови (Thompson G.J.L. et al., 1989).

В 70-80-х годах XX века широко использовали вену пуповины после фиксации в глутаровом альдегиде. Большой опыт работы с таким материалом получен Dardik H. et al.. (1976, 1978). С 1975 по 1985 гг. ими было выполнено 907 реконструкций артерий нижних конечностей (Dardik H. et al., 1988). Однако результаты операций оказались не столь обнадеживающими, как ожидалось, из-за низкой проходимости шунтов. Кроме того, серьезной проблемой оказалась склонность материала к биодеградации, что привело к образованию аневризм анастомозов, локальных расширений по ходу шунта и диффузному увеличению диаметра всего сосудистого кондуита, в связи с чем даже было предложено использовать внешнюю оболочку из дакрона (Dardik H. et al., 1984). Аналогичные результаты получены и другими исследователями, возлагавшими большие надежды на новый материал (Rondhuis J.J. et al., 1985, Nevelsteen A. et al., 1986). Известно, что ткани, фиксированные в ГА, меняют свои механические свойства из-за химического связывания волокон коллагена, быстро кальцинируют *in vivo* и вызывают иммунный ответ реципиента (Schmidt C.E., Baier J.M., 2000). Также, в исследованиях Yeh H. et al. (1984) было показано, что эндотелизация сосудов, фиксированных в ГА не происходит, вероятно, из-за того, что остатки ГА, токсичного для клеток, продолжают определяться даже через несколько недель интенсивного промывания.

Следует отметить вклад отечественных учёных в разработку биопротезов на основе скелетированной вены пуповины. Так, Лукьяновым Ю.В. (1981) была разработана оригинальная

технология консервации пуповины в течение 168 ч. в 0,2 % растворе глутарового альдегида, после чего вену выделяли и помещали в чехол из вязаной лавсановой сетки для придания повышенной прочности. Проведённый большой комплекс эксперименталььх исследований *in vitro* и *in vivo* показал, что относительная тромбогенность внутренней поверхности биопротеза не превышает аналогичной величины для аутовены, структура тканей биопротеза остается практически неизмененной по сравнению со строением нативного образца. При экспериментальной пластике биопротезом бедренных артерий собак в сроки наблюдения до одного года была получена проходимость 95%. В 1981 году протез кровеносного сосуда из консервировнной вены пуповины был разрешен к серийному производству и в последующие годы был накоплен большой опыт его использования. Результаты кооперативного коплексного исследования показали его пригодность для реконструктивных сосудистых операций на артериях нижних конечностей при отсутствии адекватного аутовенозного материала (Лебедев Л.В. и соавт., 2001).

Гасанов А.Ф.о. (2008) исследовал возможность использования в качестве протеза кровеносного сосуда артерий и вен пуповины, обработанных 70% этиловым спиртом и модифицированных гепарином. Автором отмечена легкость выделения сосудов из пупочного канатика, подходящие биологические и анатомо-гемодинамические характеристики материала, получены оптимистичные экспериментальные и даже клинические результаты. Тем не менее, следует отметить, что, как и в случае с сосудами обработанных ГА, химическая фиксация аллогенных сосудов не полностью устраняет проблему имунногености материала и препятствует рецеллюляризации клетками реципиента.

В последние годы получила развитие тканевая инженерия кровеносных сосудов, на которую возлагают большие надежды в качестве альтернативы использующимся синтетическим протезам (Shin’oka T. et al., 2005; L’Heureux N. et al., 2007). Главная задача новой науки - получение искусственных заменителей артерий и вен, соответствующих по своим свойствам естественным сосудам. Основными преимуществами тканеинженерных кровеносных сосудов (ТИКС) являются оптимальные механические свойства, атромбогенность и устойчивость к инфекции, так же как способность «приживать», перестраиваться, реагировать на внешние стимулы, и секретировать вещества, характерные для нормального кровеносного сосуда.

1.2 Концепция тканевой инженерии

Тканевая инженерия сосудов в своем классическом виде основана на заселении клетками реципиента пористого биодеградируемого носителя в форме трубки нужной длины и диаметра из различных природных или синтетических полимерных материалов, который играет роль временной основы для клеток, пока те под действием внешних факторов не сформируют

собственный внеклеточный матрикс (ВКМ) (Campbell G.R., Campbell J.H., 2007; Naito Y. et al., 2011, 2014). Образование собственного ВКМ происходит в результате активации клеток под действием биохимических и физических воздействий на «искусственный» сосуд *in vivo*, таких как давление, напряжение сдвига, растяжение; кроме того, в него проникают макрофаги, которые высвобождают ангиогенные вещества. Совокупность действия этих факторов постепенно приводит к формированию зрелого сосуда (Campbell G.R., Campbell J.H., 2007; Chen Q.-Z. et al., 2008; Naito Y. et al., 2011, 2014). Так, очевидно, что аутовенозный шунт после имплантации приобретает многие свойства артерии: в нём увеличиваются количество и размеры гладкомышечных клеток (ГМК) среднего слоя, за счёт чего становится толще стенка шунта (Kalra M., Miller V.M., 2000).

Таким образом, концепцию тканевой инженерии сосудов составляют четыре основных компонента (Рисунок 1):

1. Носитель, подходящий для совмещения с клетками.

2. Клетки, которые могут быть эффективно совмещены с носителем.

3. Способ совмещения носителя и клеток.

4. Гуморальные и механические влияния окружающей среды, межклеточные взаимодействия.

Все эти факторы оказывают значительное влияние на создание высокоорганизованной сосудистой стенки (Chen Q.-Z. et al, 2008).

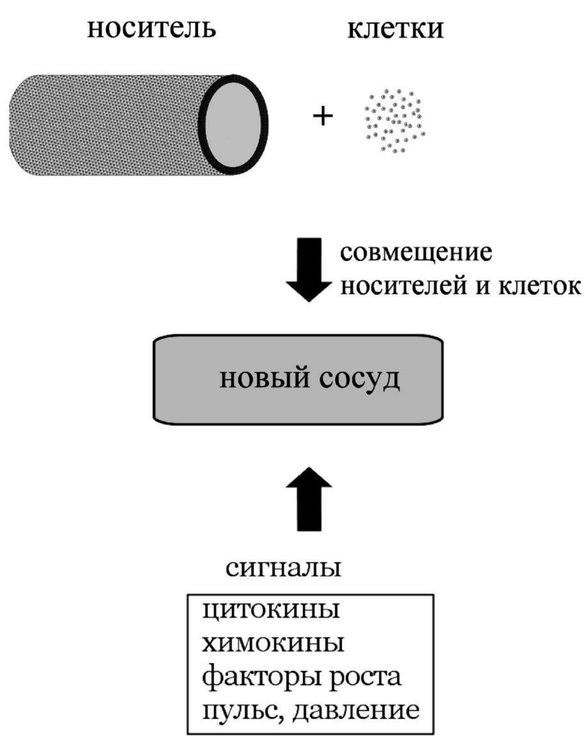


Рисунок 1 - Концепция тканевой инженерии сосудов

1.3 Основные тренды и проблемы в разработке носителей

Биодеградируемый полимерный носитель выполняет роль временной трехмерной основы для клеток, пока они не сформируют свой собственный ВКМ. Это очень важная часть будущего сосуда, которая выполняет несколько функций. Во-первых, она позволяет расположить клетки в трехмерном пространстве. Во-вторых, он задает механические свойства сосуда, такие как прочность и форма (Campbell, Campbell, 2007; Naito et al., 2011).

Для создания ТИКС можно использовать носители как из синтетических биосовместимых и биодеградируемых полимеров (Kim B.S. et al., 1998; Ravi S. et al., 2009; Udelsman B. et al., 2011), так и из естественных материалов (Berglund J.D. et al., 2003; Wray L.S. et al., 2013; Bačáková L. et al., 2014; Seib F.P. et al., 2014), к которым относятся децеллюляризованные артерии (Teebken O.E. et al., 2000; Schaner P.J. et al., 2004; Shimizu K. et al., 2007).

1.3.1 Носители на основе естественных материалов

Носители на основе коллагена

Очевидны преимущества применения естественных полимеров для создания основы будущего сосуда, из которых наиболее широко используется коллаген (Boccafoschi F. et al., 2005). Первыми, кто сообщил о создании сосуда *in vitro*, были Weinberg C., Bell E. (1986). Многослойная структура графтов напоминала структуру артерии. Для создания ТИКС были использованы коллаген, фибробласты, лейомиоциты и эндотелиальные клетки бычьей аорты. Для усиления механической прочности в стенку протеза помещалась сетка из дакрона. Сосудистые кондуиты, созданные без такой сетки, расширялись и разрывались при очень низких внутрипросветных давлениях (10 мм рт. ст.). У протеза с одной сеткой прочность на разрыв была 40–70 мм рт. ст., тогда как три слоя коллагена, чередующиеся с двумя сетками, обеспечивали прочность на разрыв до 120–180 мм рт. ст.

Причинами недостаточных механических свойств протезов, по мнению авторов, явились отсутствие эластина, продольная (вместо циркулярной) ориентация ГМК, низкая плотность ГМК и коллагена. Однако данный вид протезов кровеносных сосудов с наличием высоко дифференцированных ГКМ и функционального эндотелия, который синтезировал фактор фон Виллебранда и простациклины, привлек к себе внимание, что стало причиной дальнейших исследований в этой области.

Hirai J. et al. (1994, 1996) заливали раствор, содержащий ГМК яремной вены собаки и коллаген I типа, в стеклянную форму, получая при этом некую гибридную ткань в виде трубки, внутренняя поверхность которой была засеяна эндотелиоцитами яремной вены собаки. Получившийся ТИКС был вшит в заднюю полую вену собаки. Несмотря на низкое давление в вене, протез разорвался в течение нескольких сут. после операции. Последующие протезы были

обернуты сеткой из дакрона, чтобы предотвратить разрыв, их проходимость при этом составила 64% через 6 мес. О полной перестройке графта свидетельствовало образование продольно-ориентированного эндотелиального монослоя на внутренней поверхности, наличие циркулярно-ориентированных лейомиоцитов контрактильного фенотипа в субинтимальном слое, вросших фибробластов по всей толще сосудистой стенки, сети волокон коллагена в межклеточном пространстве и образование мембраны из эластина в субинтимальном слое.

Kanda K. et al. (1993, 1994) представили методику циркулярной ориентации ГМК и продольной ориентации эндотелиальных клеток (ЭК), в стенке искусственного сосуда под действием потоковой силы сдвига, что, как ожидалось, увеличивает механическую прочность и улучшает вазомоторную реакционную способность графта. Исследователи предположили, что пульсирующий поток через искусственный сосуд, основанный на коллагеновом каркасе, будет способствовать ориентации ЭК параллельно направлению потока и выравниванию ГМК параллельно направлению напряжения, то есть, циркулярно. Авторы использовали нерассасывающийся носитель из полиуретана с коллагеновым гелем, содержащим ГМК собаки. Аутологичные ЭК засевались на внутреннюю поверхность сосуда для создания интимы, и протез подвергали воздействию пульсирующего потока культуральной среды. Через 10 сут. воздействия ЭК располагались параллельно продольной оси протеза, а ГМК были ориентированы в циркулярном направлении. В начальных экспериментах по оценке влияния прямого пульсирующего потока на незрелый искусственный сосуд требовалось использование каркаса из полиуретана. Чтобы этого избежать исследователи применили эластичную силиконовую трубку в биореакторе. Гибридная тканеинженерная конструкция, состоящая из коллагена I типа и ГМК бычьей аорты, была расположена вокруг этой трубки, которую циклично надували. Через 5 сут. культивирования в таких условиях, и ГМК и коллагеновые волокна были расположены циркулярно.

Однако синтезировать достаточно протяженную конструкцию из коллагена со структурой нативного сосуда пока не удается. Кроме того, до сих пор механическая прочность искусственных сосудов с основой из коллагена остается невысокой (Kakisis J.D. et al., 2005).

Носители на основе децеллюляризованных сосудов

Интересным выглядит предложение использовать в качестве биодеградируемого носителя аллогенный или ксеногенный кровеносный сосуд, удалив из него все клеточные элементы, оставив только ВКМ (Teebken O.E. et al., 2000; Dahl S.L.M. et al., 2003; Schaner P.J. et al., 2004; Crapo P.M. et al., 2011). Этот процесс называется децеллюляризацией и заключается в максимально полном удалении клеток и их остатков (клеточного дебриса) с минимальным повреждением соединительнотканного каркаса сосуда, который должен быть пригоден для дальнейшего заселения клетками реципиента (то есть для рецеллюляризации).

Преимущества ВКМ кровеносных сосудов, полученных методом децеллюляризации, заключаются в их естественной структуре, сохраненной механической прочности, минимальных иммуногенных свойствах, максимально благоприятных, естественных условиях для роста клеток реципиента (Dahl S.L.M. et al., 2003; Murase Y. et al., 2006; Zhao Y. et al., 2010). В связи с этим неудивительно, что в настоящее время большинство стратегий создания искусственного сосуда направлены на получение децеллюляризованного соединительнотканного каркаса сосуда, который может быть засеян клетками реципиента *in vitro* до трансплантации (McFetridge P.S. et al., 2004; Kakisis J.D. et al., 2005; Murase et al., 2006; Fitzpatrick J.C., 2010; Krawiec J.T., Vorp D.A., 2012).

Как правило, для децеллюляризации используют многоэтапную обработку растворами детергентов и-или ферментов. Полученный ВКМ сосуда изучают на предмет наличия клеток, их остатков (главным образом антигенов поверхности клеточных мембран и нуклеиновых кислот) гистологическими, иммуногистохимическими (ИГХ) методами, для исследования ультраструктуры используют электронную микроскопию. Так же изучают прочностные характеристики – усилие на разрыв, эластичность, сопротивление к прорезыванию шовным материалом и прочее. Следует иметь ввиду, что помимо возможных изменений структуры ВКМ при слишком агрессивной децеллюляризации, остатки детергентов обладают цитотоксическими свойствами и могут стать причиной отсутствия роста клеток на децеллюляризованной ткани (Cebotari S. et al., 2010).

Williams C. et al. (2009) оценивали структурные и механические свойства децеллюляризованных сонных артерий кролика. Использовалась сложная многоэтапная обработка с многократной сменой реагентов в течение 7 сут. При микроскопии полученных ВКМ клеток найдено не было, а большинство элементов матрикса, осталось нетронутым. Однако, исследование механических свойств показало, что полученные сосуды становится жестче и менее растяжимым в сравнении с нативной артерией.

Böer U. et al. (2011) предложили более простую и доказательно эффективную методику деллюляризации, с использованием 0,5% раствора додецилсульфата натрия, 0,5% дезоксихолата натрия и эндонуклеазы.

Y. Zou, Y. Zhang (2012) проводя децеллюляризацию грудной аорты свиньи пришли к выводу, что использование трипсина серьезно повреждает ВКМ и ведет, таким образом, к потере механической прочности сосуда, хотя все клетки и ядерные компоненты его удаляются эффективно. Применение же комбинации этилендиаминтетрауксусной кислоты и додецилсульфата натрия либо тритона Х-100 с последующей обработкой РНКазой А и ДНКазой I так же приводили к надёжной децеллюляризации, но не изменяли структуру сети коллагена и эластина в ВКМ. При этом эластичность материала соответствовала таковой нативной аорты.

Впечатляющие результаты получены Zhao Y. et al. (2010), которые децеллюляризовали сонные артерии овец следующим образом. После двукратного замораживания-оттаивания сосуды погружали на 72 ч. в 75% этанол, после чего их подвергали воздействию 0,125% пепсина и нуклеаз по 4 ч. Затем препараты высушивали лиофилизацией и стерилизовали оксидом этилена. При этом микроскопически в полученных сосудах внеклеточные микроструктуры остались интактны, каркас имел пористую структуру, состоящую из коллагена, эластина и гликозоаминогликанов. Оценка механических свойств этих сосудов показала, что усилие на разрыв и устойчивость к прорезыванию шовного материала практически не отличались от таковых у нативной артерии. После проведённой в дальнейшем рецеллюляризации графтов аутологичными МСК, были протезированы сонные артерии овец-доноров клеток. Засеянные клетками кондуиты оставались проходимы в течение 5 месяцев наблюдения, в то время как незасеянные тромбировались не позднее двух недель от момента пересадки. При гистологическом, ИГХ исследовании и электронной микроскопии было доказано наличие в их стенке эндотелия, ГМК, коллагена и эластина. МСК, меченные флюоресцентным красителем, были обнаружены в созданном графте через 2 месяца после имплантации, что говорит об их выживании и вкладе в регенерацию ткани сосуда. Время, необходимое на создание такого ТИКС составило 1 неделю.

Необходимо отметить, что одним из недостатков использования децеллюляризованных тканей является нехватка исходного донорского материала. Особенно это касается сосудов человеческого происхождения, забор которых связан с рядом этических проблем (Волова Т.Г., 2009). Интересный выход из этой ситуации, основанный на применении ксеногенного материала, нашли исследователи из Йельского университета и Медицинского центра Дюкского университета в Дурхаме, США, которые описали тканеинженерный метод создания кровеносного сосуда любого размера с использованием децеллюляризации (Dahl S.L.M. et al., 2011; Quint C. et al., 2011). Сначала, в специальном биореакторе культивировали ксеногенные ГМК аорты на быстродеградируемом трубчатом носителе из полигликоливой кислоты (ПГК) нужного размера (3-6 мм в диаметре) в течение 10 нед., пока клетки не сформируют свой собственный ВКМ. Затем полученный тканеинженерный сосуд децеллюляризовали и ВКМ заселяли аутологичными клетками реципиента. Необходимо отметить, что при таком способе получения ТИКС сохраняются риски, связанные с наличием ксеногенных белков ВКМ, даже несмотря на отсутствие ксено-клеток в результате децеллюляризации.

1.3.2 Носители на основе синтетических материалов

Носители из синтетических биодеградируемых материалов могут быть синтезированы в любом количестве, различных форм и размеров. Кроме того, они обладают высокой

прочностью, могут быть простерилизованы и храниться в стандартных условиях достаточно долгое время без потери своих свойств (Niklason L.E. et al., 1999; Berglund J.D. et al., 2003; Kakisis J.D. et al., 2005). Чаще всего для создания сосудистых матриксов используют ПГК. Носители из ПГК теряют свою прочность в течение 4 нед. и полностью резорбируются к 4-6 мес. (Ravi S. et al., 2009; Kim B.-S. et al., 2011; Naito Y. et al., 2011).

Одна из проблем обсуждаемых трансплантатов заключается в скорости биодеградации, которая должна в значительной степени совпадать с временем образования собственного ВКМ сосуда (Kakisis J.D. et al., 2005; Naito Y. et al., 2011). Скорость же продукции компонентов ВКМ клетками вариабельна, и особенно зависит от возраста пациентов. Если разрушение носителя произойдет быстрее, чем сформируется нормальная стенка сосуда, то возникает риск разрыва трансплантата.

Скорость биодеградации можно менять, образуя комбинации ПГК с другими полимерами, например, с полигидроксиалканоатами (Gogolewski S. et al., 1993; Shum-Tim D. et al., 1999; Hoerstreup S.P. et al., 2002), полимолочной кислотой (Mooney D.J. et al., 1996; Watanabe M. et al., 2001), поли(ε-капролактоном) (Watanabe M. et al., 2001; Shin'oka T. et al., 2005; Mathews A. et al., 2012) и полиэтиленгликолем (Wake M.C. et al., 1996). Материал, из которого изготавливают носители, определяет и механические свойства каркаса, и регулирует фенотип клеток, с ним совмещенных (Kim B.-S. et al., 2011) (Таблица 1).

Таблица 1 - Сравнительные характеристики полимеров, используемых для создания биодеградируемых каркасов кровеносных сосудов

Синтетический полимер	Прочность, МПа	Эластичность, ГПа	Растяжимость, % (до разрыва)	Период рассасывания
Полигликолевая кислота	890	8.4	30	2-3 нед.
Полимолочная кислота	900	8.5	25	6-12 мес.
Комбинация полимолочной кислоты и поли(ε-капролактон) в соотношении 75 / 25	500	4.8	70	8-10 нед.
Комбинация полимолочной кислоты и поли(ε-капролактон) в соотношении 50 / 50	12	0.9	600	4-6 нед.
поли(ε-капролактон)	50	0.3	70	12 нед.
Полигидроксибутират	43	-	5	>6 нед.

(адаптировано из Naito Y. et al., 2009)

Для создания матрицы из полимеров используется методика электроспиннинга - процесс получения сверхтонких нитей/нановолокон из раствора полимера на вращающемся стержне под действием электростатических сил, создаваемых источником высокого напряжения (Mo X.M. et al., 2004; Xu C. et al., 2004; Ingavle G.C. et al., 2013). Толщину волокон и размер пор можно изменять, варьируя параметрами жидкости, поля и скорости вращения стержня (Campbell G.R., Campbell J.H., 2007; Naito Y. et al., 2011; Kim B.-S., 2011). Другим способом является растворение полимера в диметилсульфоксиде с порообразующими солями, заливкой в заданную форму с последующим фазоинвертированием и лиофилизацией (Wake M.C. et al., 1996; Williams C., Wick T.M., 2004; Solchaga L.A. et al., 2006; Roh J.D. et al., 2007). Описана также комбинированная методика создания двухслойного композитного полимерного носителя с наружным слоем из полиестеруретана и внутренним из ПТФЭ (Nieponice A. et al., 2008, 2010).

Стоит отметить, что, несмотря на то, что сама ПГК обладает хорошей биосовместимостью, продукты её распада могут вызвать воспалительный ответ (Nerem R.M., Seliktar D., 2001; Zhang W.J. et al., 2007). Носители из ПГК подвергаются гидролизу с образованием воды и углекислого газа (Ravi S. et al., 2009; Naito Y. et al., 2011; Kim B.-S., 2011). Higgins S.P. et al. (2003) обнаружили, что углекислота, образующаяся в результате деградации ПКГ, может привести к дедифференцировке и снижению пролиферативной активности ГМК.

Степень пористости, как и размер пор синтетического носителя, очень важны, и этот вопрос обсуждается в литературе. Большинство исследователей оптимальным размером пор носителя считают 100-150 мкм (O’Brien F.J. et al., 2007; Murphy C.M., O’Brien F.J., 2010; Sobrai J.M. et al., 2011). Пористость определяет не только способ совмещения носителя с клетками и его эффективность, но также влияет на поведение клеток после заселения (O’Brien F.J. et al., 2007; Murphy C.M., O’Brien F.J., 2010). Чем крупнее поры носителя, тем проще, быстрее и равномернее можно произвести заселение его клетками (Ma H., 2010; Sobrai J.M. et al., 2011; Naito Y. et al., 2011). Это способствует также лучшей диффузии питательных веществ и неоваскуляризации после имплантации. Для того, чтобы крупнопористые графты могли держать давление кровотока и не «протекать» после трансплантации, проводится предварительное инкубирование *in vitro*, как правило, в специальном биореакторе, чтобы клетки могли сформировать свой собственный ВКМ (Sodian R. et al., 2002).

Таким образом, главное преимущество носителей из синтетических биодеградируемых материалов заключается в удобстве и воспроизводимости их создания с заданными параметрами, такими как диаметр, толщина стенки, скорость деградации, пористость и размер пор. Это, в совокупности с биосовместимостью материалов, обеспечивающей рост клеток на них и отсутствие реакции со стороны реципиента, а также их достаточной механической прочностью, обеспечило их широкое применение в разработке ТИКС. Примерами успешного

использования ТИКС на основе носителей из синтетических материалов в эксперименте могут служить работы Niklason L. et al. (1999), Shum-Tim D. et al. (1999) и Shin'oka T. et al. (2005).

1.4 Основные типы клеток, совмещаемые с носителями с целью создания графтов сосудов

Наличие в составе тканеинженерного эквивалента оптимального количества функционально активных клеток, способных поддерживать соответствующий фенотип и выполнять конкретные биологические функции, является одним из основных факторов успеха (Teebken O.E. et al., 2000; Hoerstrup S.P. et al., 2002; Dahl S.L.M. et al., 2003; Mathews A. et al., 2012; Krawiec J.T., Vorp D.A., 2012). Клетки пролиферируют и продуцируют компоненты ВКМ (в частности, коллаген) соответствующей организации и структуры, выделяют цитокины и другие биологически активные вещества, а также взаимодействуют с соседними клеткам или тканями. Варианты клеток, применяющихся для создания ТИКС, весьма многочисленны.

Эндотелиальные и гладкомышечные клетки

Логичным выглядит предложение использовать высокодифференцированные клетки сосудистой стенки, а именно эндотелиоциты и ГМК, для получения ТИКС. Однако их основные недостатки, такие как ограниченный пролиферативный потенциал, необходимость использования особых условий культвирования (покрытий и присадок), значительно затрудняют их использование (Parikh S.A., Edelman E.R., 2000; Villalona G.A. et al., 2010; Bajpai V.K., Andreadis S.T., 2012; Nemeno-Guanzon J.G. et al., 2012).

Стволовые и прогениторные клетки

Существуют и другие потенциальные клеточные субстраты, в том числе стволовые и прогениторные клетки различных типов. При этом ключевыми требованиями, предъявляемыми к таким клеточным популяциям, являются относительная доступность тканевого источника их получения, возможность эффективной экспансии клеток *in vitro* с наработкой значительного количества в течение короткого времени, возможность заселения ими носителей с сохранением механических свойств и, наконец, их функциональность *in vivo* (Hashi C.K. et al., 2007; Zhao Y. et al., 2010). Учитывая совокупность перечисленных выше критериев, наиболее перспективными клеточными типами являются эндотелиальные прогениторные клетки (ЭПК) и МСК, полученные из различных источников (Stegemann J.P. et al., 2007; Peck M. et al., 2011; Bajpai V.K., Andreadis S.T., 2012; Nemeno-Guanzon J.G. et al., 2012).

Эндотелиальные прогениторные клетки

К настоящему времени идентифицировано несколько популяций ЭПК, в первую очередь, циркулирующие в периферической крови. Однако без проведения процедуры мобилизации костного мозга, имеющей высокую стоимость и связанной с риском развития ряда осложнений,

число выделяемых из умеренного объема периферической крови ЭПК крайне невелико, а их экспансия *in vitro* малоэффективна, так как основана на применении дорогостоящих реагентов и имеет низкий «выход», основанный на относительно низком пролиферативном потенциале таких клеток (Bajpai V.K., Andreadis S.T., 2012).

Более привлекательным является применение эндотелиальных клеток пупочной вены человека (*HUVEC*), совокупность биологических свойств которых соответствует ЭПК (Howard D. et al., 2008). Такие клетки широко используют в качестве модели ЭПК, при этом они относительно доступны и обладают высокой пролиферативной активностью, которая обеспечивает их эффективную экспансию *in vitro* в относительно простых условиях. Заселение внутренней поверхности носителей клетками первичных культур *HUVEC* позволяет придать сосудам необходимые биологические характеристики, однако формирует и иммуногенные свойства. Аллогенное происхождение *HUVEC* делает необходимым проведение иммуносупрессивной терапии, имеющей высокую стоимость и связанной с риском возникновения ряда осложнений. До настоящего времени, применение аллогенных клеток, в том числе прогениторных, а также специализированных клеток сосудов пуповины, таких как эндотелиоциты (*HUVEC*) и ГМК, ограничено их использованием только в доклинических исследованиях в качестве моделей для отработки способов совмещения клеток и их носителей и оценки работы сосудистых графтов в эксперименте (Howard D. et al., 2008; Peck M. et al., 2011; Bajpai V.K., Andreadis S.T., 2012).

Мезенхимные стволовые клетки

МСК обладают такими ключевыми свойствами, как высокая пролиферативная активность и способность к дифференцировке в различные типы специализированных клеток. При этом они могут быть легко получены в необходимом количестве в аутогенном варианте, в отличие от *HUVEC* и стволовых клеток пуповинной крови, что делает использование МСК для создания ТИКС привлекательным (Nieponice A. et al., 2008; Zhao Y. et al., 2010). Особенно широко применяются МСК, полученные из костного мозга (МСК КМ), где численность их популяции составляет лишь 0,01–0,001% от общего числа ядросодержащих клеток. Однако безопасная эксплантация значительных объемов костного мозга, а также высокая пролиферативная активность МСК КМ *in vitro* обеспечивают быстрое получение необходимого количества функционально активных клеток (Bajpai V.K., Andreadis S.T., 2012).

Альтернативным костному мозгу тканевым источником МСК является жировая ткань, аспирация которой является еще более легкой и безопасной процедурой, чем получение костного мозга. Выделение первичной популяции МСК жировой ткани (МСК ЖТ), экспансия *in vitro* до необходимого количества клеток является к настоящему отработанной и стандартизированной методикой (Howard D. et al., 2008; Bajpai V.K., Andreadis S.T., 2012;

Nemeno-Guanzon J.G. et al., 2012). Более того, по данным ряда авторов, МСК ЖТ обладают более высокой пролиферативной активностью по сравнению с МСК КМ того же донора, что делает их применение в создании ТИКС еще более привлекательным (Hass R. et al., 2011; Bajpai V.K., Andreadis S.T., 2012).

Совмещение носителей с МСК разных типов позволяет получить ТИКС, функция которого будет опосредована двумя механизмами. Во-первых, МСК могут дифференцироваться (*in vitro* и *in vivo*) в эндотелиоциты (прямой механизм). Во-вторых, МСК секретируют сложный комплекс цитокинов, в том числе хемоаттрактантов для циркулирующих ЭПК и индукторов/регуляторов дифференцировки ЭПК в функциональные эндотелиоциты (паракринный эффект) (Howard D. et al., 2008; Bajpai V.K., Andreadis S.T., 2012; Krawiec J.T., Vorp D.A., 2012).

1.5 Способы совмещения различных носителей и клеток

Принято считать, что именно совмещение клеток с носителем является ключевым моментом создания тканеинженерных кровеносных сосудов (ТИКС) (Nieponice A. et al., 2008; Villalona G.A. et al., 2010; Krawiec J.T., Vorp D.A., 2012; Mohebbi-Kalhori D. et al., 2012). В нескольких исследованиях было доказано, что независимо от типа основы будущего сосуда наличие клеток улучшает его проходимость (Pawlowski K.J. et al., 2004; Cho S.-W. et al., 2005; Hashi C.K. et al., 2007). В настоящее время нет единого стандартизированного подхода к способу заселения клетками трехмерного матрикса. За последние три десятилетия было предложено множество методик, но большинство из них слишком длительны, связаны с нежелательным воздействием на клетки и применимы только в эксперименте (Parikh S.A., Edelman E.R., 2000; Yow K.-H. et al., 2006).

Статичный метод

Наиболее распространенным методом совмещения клеток с носителем является в настоящее время так называемый статичный (пассивный, гравитационный), заключающийся во введении концентрированной клеточной суспензии с помощью пипетки непосредственно в просвет или нанесении её на наружную поверхность заселяемого материала (Рисунок 2) (Teebken O. E. et al., 2000; Villalona G. A. et al., 2010; Udelsman B. et al., 2011).

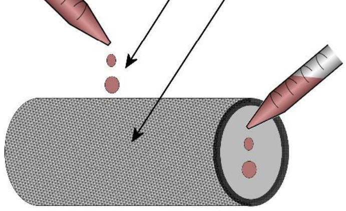


Рисунок 2 - Статичный метод совмещения клеток и носителя: 1 – пипетка; 2 – клеточная суспензия; 3 – заселяемый носитель

Клетки под действием силы тяжести оседают на матриксе. После этого будущий сосуд помещают в чашку Петри с ростовой средой и инкубируют в течение нескольких часов или суток. Эффективность совмещения оценивается в процентном отношении адгезировавших на матриксе клеток к их исходному количеству. Этот показатель для данной методики составляет 10–25% (Roh J. D. et al., 2007). Помимо низкой эффективности использования клеточной культуры, что особенно важно при её ограниченном количестве, применение такого подхода уменьшает проникновение клеток вглубь сосудистой стенки, что зависит ещё и от пористости носителя (Mo X. M. et al., 2004; Pawlowski K. J. et al., 2004; Ma P. X., 2008; Ravi S. et al., 2009; Villalona G. A. et al., 2010). С одной стороны, это может быть полезно при заселении просвета мелкопористых носителей эндотелиоцитами, поскольку при этом клетки будут оставаться только на внутренней поверхности графта, не проникая вглубь его стенки. С другой стороны, при статичном заселении крупнопористых носителей, наоборот, легче достигается равномерное распределение клеток по всей толще стенки матрикса, если дело касается ГМК, МСК, фибробластов.

Для того, чтобы получить однородное распределение клеток по всей поверхности матрикса проводят периодическое вращение конструкции, либо культивирование в течение достаточно продолжительного времени (Roh J. D. et al., 2007; Villalona G. A. et al., 2010). Последнее, однако, повышает риск контаминации и может стать причиной нежелательной трансформации клеток (Pawlowski K. J. et al., 2004; Villalona G. A. et al., 2010). Кроме того, метод сильно зависит от квалификации оператора (Villalona G. A. et al., 2010).

Данный подход может быть реализован с любым типом носителя и любыми клетками, но чаще всего используется для децеллюляризованных тканей (Teebken O. E. et al., 2000; Dahl S. L. M. et al., 2003; Cho S.-W. et al., 2005; Zhao Y. et al., 2010). Это связано, с тем, что методы активного внедрения клеток (центрифугирование, вакуумирование и т.п.) позволяют гораздо быстрее и равномернее совместить клетки с синтетическими носителями, но они не эффективны для децеллюляризованных сосудов из-за малого размера пор и огромного гидродинамического сопротивления тканей (Kim B. S. et al., 1998; Schmidt C. E., Baier J. M., 2000).

Использование веществ, улучшающих адгезию клеток на носителе

Иногда, для улучшения клеточной адгезии и повышения эффективности совмещения, внутреннюю поверхность носителя предварительно покрывают одним или несколькими биологически активными веществами, из которых наиболее часто используют желатин, фибронектин, фибрин, коллаген, полиорнитин, ламинин и плазму (Salacinski H. J. et al., 2001; Sagnella S. et al., 2005). Чаще всего эти вещества используют с синтетическими матриксами, повышая их биосовместимость. A. Mathews et al. (2012) совмещали мелкопористые

синтетические носители из поликапролактона, покрытые фибрином, с эндотелиоцитами, получая функционально-активный эндотелиальный монослой.

Интересно отметить, что децеллюляризованные артерии, в отличие от синтетических носителей, не требуют такой обработки, так как они состоят практически полностью из коллагена и содержат в оптимальных количествах фибронектин, являющийся внеклеточным белком (Udelsman B. et al., 2011). Методы покрытия ТИКС биоактивными веществами могут быть различными: от простого погружения протеза в раствор до его перфузии (Pawlowski K. J. et al., 2004; Stephan S. et al., 2006).

Одной из главных проблем использования веществ, повышающих адгезию клеток, является их потенциальная тромбогенность: если клетки не покроют всю внутреннюю поверхность носителя, то останутся «открытые» участки, доступные для прикрепления тромбоцитов и формирования тромба. Для повышения числа клеток, осаждаемых на матрикс, исследуется возможность иммобилизации на нём биоактивных пептидов, которые способствуют улучшению клеточной адгезии и распределению клеток в толще матрикса (Drumheller P. D., Hubbell J. A., 1994; West J. L., 2004). Трансформирующий фактор роста-β (TGF-β) может быть применен для увеличения синтеза внеклеточных белков ГМК и улучшения механических свойств ТИКС (Mann B. K. et al., 2001; West J. L., 2004). В настоящее время редкое применение биоактивных пептидов обусловлено недостаточно хорошо изученными аспектами безопасности, возможной иммуногенностью и их потенциальным нежелательным влиянием на используемые клетки (Villalona G. A. et al., 2010).

Вещества, способствующие адгезии клеток, могут оказаться полезными в случае сочетания их с динамическими способами заселения, когда достигается полное покрытие внутренней поверхности ТИКС клетками.

Динамические методы

Неудовлетворенность исследователей результатами статичного засевания клеток привела к разработке способов ускоренной их доставки с помощью разницы давлений, центробежных, электростатических, магнитных сил и их комбинаций. В этом случае значительно повышается эффективность использования клеток, однородность и глубина внедрения их в структуру носителя.

Полая трубчатая структура матрикса становится преимуществом и играет ключевую роль во многих описываемых методах, соответственно их применение в тканевой инженерии других тканей ограничено.

Механическое перемешивание, вращение

Использование простого механического перемешивания питательной среды, в которой находятся носитель и клетки, например, на орбитальном шейкере, позволяет повысить число

контактов клеток с матриксом (Blum J. S. et al., 2004). Kim B. et al. (1998) обратили внимание, что таким образом уже через 20 ч. количество прикрепившихся ГМК увеличивалось в 10 раз по сравнению со статичным заселением.

В ряде работ использовали вращательное движение клеточной суспензии при помощи спиннер-фласка или магнитного миксера вокруг засеваемого матрикса, находящегося в центре культуральной емкости (Kim B. S. et al., 1998; Godbey W. T. et al., 2004; Yasuda K. et al., 2004). Клетки, как более тяжелые частицы, под действием центростремительной силы стремились к центру емкости, образуя, таким образом, высокую концентрацию вокруг носителя, что способствовало повышению эффективности использования клеточной популяции (Рисунок 3). Скорость вращения составляла около 50 об/мин, продолжительность в среднем 24 ч. При этом не описаны какие-либо вредные воздействия на клетки, но отмечено улучшение циркуляции питательной среды, повышение числа контактов клеток с носителем. Однако, способ не эффективен при низких концентрациях клеток в суспензии (Vunjak-Novakovic G. et al., 1998). В связи с тем, что использование данного метода приводит к адгезии клеток на внешней стороне носителя, его применяют только для посева фибробластов, ГМК и МСК.

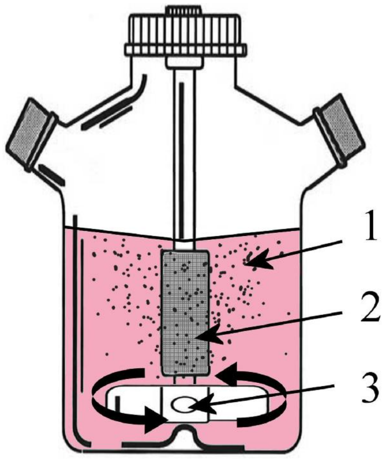


Рисунок 3 - Динамический метод (вращение) совмещения клеток и носителя: 1 – клеточная суспензия; 2 – заселяемый носитель; 3 – миксер

Повысить однородность распределения клеток в стенке матрикса можно, вращая носитель, заполненный клеточной суспензией, в горизонтальном положении со скоростью от 0,16 до 5 об/мин (Hsu S. et al., 2005). Этот прием используют как с эндотелиоцитами, так и с другими клетками, поскольку их совмещение с носителем ведётся в направлении изнутри-кнаружи. Так, в исследовании Wang S. et al. (2013) синтетический носитель из ко-полимера молочной кислоты заполняли суспензией эндотелиоцитов, после чего обеспечивали вращение матрикса в горизонтальном положении со скоростью 5 об/мин в течение 7 сут., получая эндотелиальный монослой на внутренней поверхности графта. Nasseri B. et al. (1993) совмещали миофибробласты с носителем из кополимера ПГК, получая к 10 дню полную

инфильтрацию стенки носителя клетками.

В других исследованиях скорость вращения была гораздо больше – от 1000 до 6000 об/мин (Godbey W. T. et al., 2004; Wolf M. et al., 2006; Roh J. D. et al., 2007; Ng R. et al., 2010; Way L. et al., 2011). В данных системах использовалась центробежная сила для улучшения проникновения клеток вглубь стенки носителя. Матрикс, заполненный клеточной суспензией, вращали вокруг продольной оси, чем достигалось движение клеток в направлении от условного центра графта к его стенке (Рисунок 4). Такие системы значительно увеличивали эффективность использования клеток: до 90% культуры проникали и равномерно распределялись в структуре матрикса при небольшой продолжительности центрифугирования (Godbey W. T. et al., 2004; Roh J. D. et al., 2007; Ng R. et al., 2010). При этом клетки не только сохраняли свою жизнеспособность, но и строение (Wolf M. et al., 2006; Ng R. et al., 2010; Way L. et al., 2011). Godbey W. et al. (2004), в частности, показали, что совмещение ГМК и фибробластов с носителем из ПГК с помощью центрифугирования позволяет в течение 10 мин добиться трехкратного увеличения эффективности заселения по сравнению со статичным методом или использованием спиннер-фласка. Однако чем меньше диаметр сосуда, тем выше должна быть скорость вращения для создания нужной силы относительного ускорения, и тем сложнее поддерживать ось вращения. Кроме того, стандартные центрифуги не подходят для реализации этого метода, что требует либо создания самодельных устройств, либо конструирование специального ротора для имеющейся центрифуги (Godbey W. T. et al., 2004).

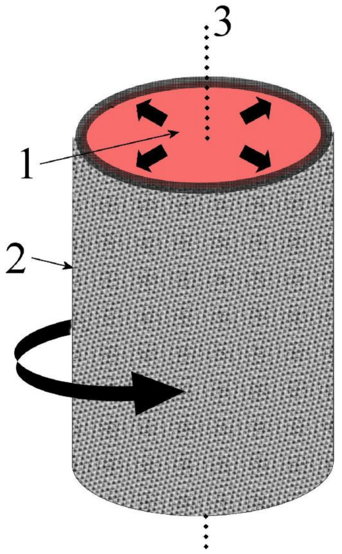


Рисунок 4 - Направления движения клеток в суспензии под действием центробежной силы при центрифугировании носителя вокруг продольной оси: 1 – клеточная суспензия; 2 – заселяемый носитель; 3 – продольная ось

Этот способ не применим для эндотелиоцитов при использовании крупнопористых синтетических носителей в связи с их проникновением далеко вглубь стенки матрикса, где они

не будут выполнять свои функции. В то же время центрифугирование может оказаться полезным при эндотелизации децеллюляризованных сосудов и других мелкопористых носителей, так как из-за мелкого размера пор, эндотелиоциты окажутся распластаны на внутренней поверхности графта. Исследования такого рода пока проведены не были, но представляются весьма перспективными.

Временное изменение электростатического заряда носителя

Для улучшения адгезии эндотелиальных клеток к внутренней поверхности носителей из политетрафторэтилена (ПТФЭ) был предложен способ, основанный на изменении электростатических свойств: заряд стенки матрикса их ПТФЭ, который в норме является отрицательным, меняется на положительный для улучшения прикрепления и созревания эндотелиоцитов. Экспозиция клеток всего лишь в течение 16 мин в таких системах повышает эффективность заселения до 90% (Bowlin G. L. et al., 2001; Pawlowski K. J. et al., 2004). К достоинствам способа относят возможность достичь быстрой морфологической зрелости клеток до трансплантации, что подтверждено результатами сканирующей электронной микроскопии (Bowlin G. L. et al., 2001; Fields C. et al., 2002). Улучшение удержания клеток на поверхности носителя подтверждено исследованием флюоресцентых меток через 1 нед. после имплантации (Bowlin G. L. et al., 2001). В отличие от рассмотренных ранее веществ, улучшающих клеточную адгезию, электростатическое воздействие на протез носит временный характер и не связано с повышением тромбогенности (Fields C. et al, 2002). С другой стороны, этот способ не изучен на современных биодеградируемых матриксах, например, из ПГК и её ко-полимеров, что требует дальнейших исследований.

Использование вакуума

С середины 80-х годов XX века исследуются системы, использующие для совмещения носителей с клетками разницу давлений (Kempczinski R. F. et al., 1985). Они подразумевают применение вакуума либо с внутренней (Williams C., Wick T. M., 2004; Udelsman B. et al., 2011), либо с наружной стороны (van Wachem P. B. et al., 1990; Nieponice A. et al., 2008) носителя для улучшения прохождения клеточной суспензии через микропоры материала (Рисунок 5; Рисунок 6). При этом жидкая часть клеточной суспензии достаточно свободно проникает сквозь стенку засеваемой основы, которая выполняет роль своеобразного мембранного фильтра, тогда как клетки «застревают» в его порах. Такие системы позволяют чрезвычайно быстро, в течение 10 мин, заселить ТИКС с эффективностью от 60 до 90% (van Wachem P. B. et al., 1990; Nieponice A. et al., 2008; Villalona G. A. et al., 2010). Более того, в отличие от статичного совмещения этот метод не зависит от оператора (Udelsman B. et al., 2011). Solchaga L. et al. (2006) исследовали адгезию человеческих МСК костного мозга к синтетическому матриксу из ко-полимера ПГК с пористостью 80% и средним размером пор 83 мкм. Оказалось, что использование вакуума (-85

мм рт. ст.) в течение 10 мин позволяет добиться увеличения эффективности минимум в 2 раза, по сравнению со статичным методом заселения в течение 72 ч. Авторы сделали вывод, что метод является быстрым, воспроизводимым и безопасным. Кроме того, доказано отсутствие негативного влияния на функции и жизнеспособность клеток (Solchaga L. A. et al., 2006).

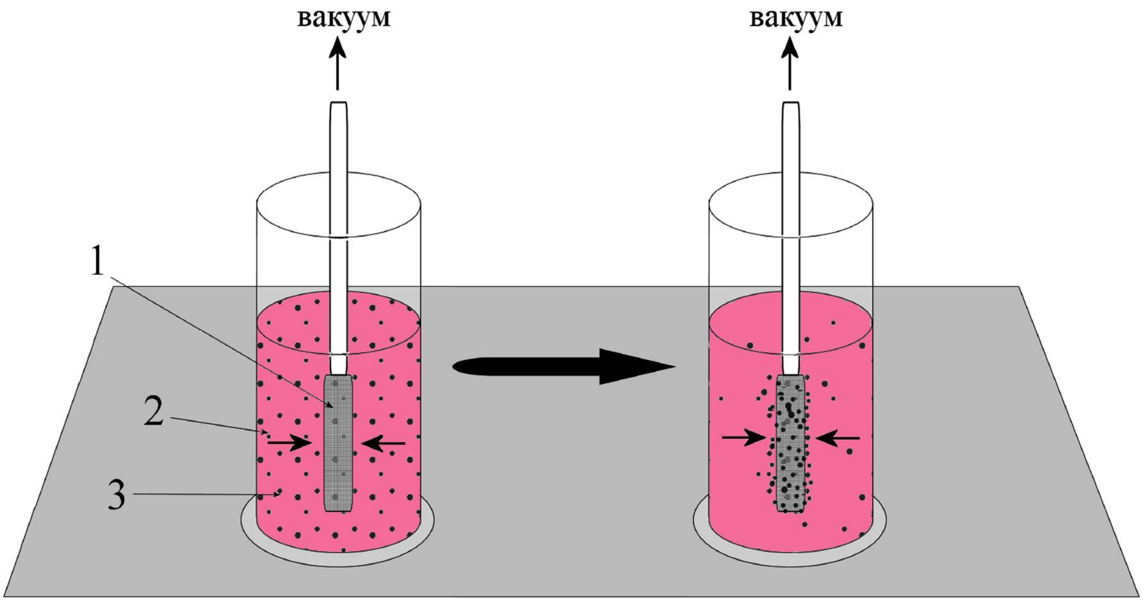


Рисунок 5 - Динамический метод совмещения клеток и носителя: создание вакуума с внутренней стороны носителя: 1 – заселяемый носитель; 2 – направление движения клеток; 3 – клеточная суспензия

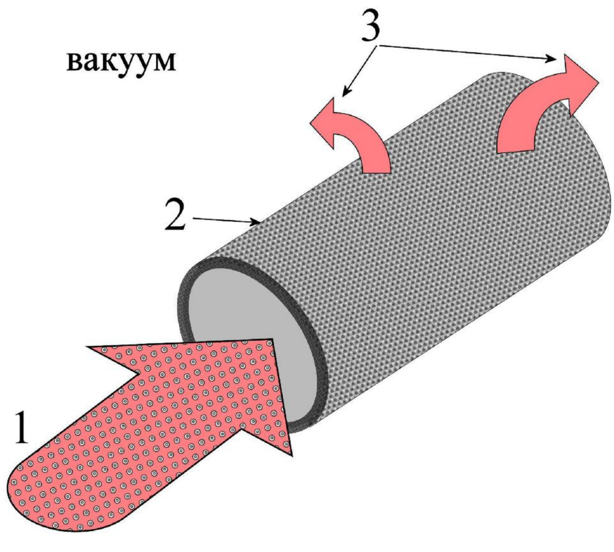


Рисунок 6 - Динамический метод совмещения клеток и носителя: создание вакуума с наружной стороны носителя: 1 – клеточная суспензия; 2 – заселяемый носитель; 3 – культуральная среда без клеток

Использование сил магнитного притяжения

Интересен способ совмещения клеток с носителем, основанный на использовании сил

магнитного притяжения для увеличения эффективности заселения. Одним из вариантов является применение суперпарамагнитных одноразмерных полимерных наночастиц «*dynabeads*» (DynaBiotec, Норвегия), способных соединяться с выбранным типом клеток, молекулой или белком (Perea H. et al., 2006). Клетки, меченные «*dynabeads*», могут быть засеяны на матрикс с использованием временного магнитного поля менее чем за час с последующим 12-часовым культивированием, а эффективность совмещения достигает 99% (Tiwari A. et al., 2003; Perea H. et al., 2006). Другим вариантом является применение суперпарамагнитных наночастиц оксида железа (*superparamagnetic iron oxide nanoparticles, SPION*), которые внедряют внутрь клетки (Gonzalez-Molina J. et al., 2012). Полученный комплекс засевают на матрикс, внутрь которого помещают магнит (Рисунок 7). Через несколько мин. магнитного воздействия и 24 ч последующего культивирования количество адгезированных клеток составило более 90% (Ito A. et al., 2005; Shimizu K. et al., 2007; Gonzalez-Molina J. et al., 2012). Магнитные наночастицы могут быть использованы с любыми типами клеток и носителей, в том числе с децеллюляризованными артериями (Teebken O. E. et al., 2000), что является несомненным преимуществом. Более того, описано последовательное совмещение фибробластов, ГМК и эндотелиоцитов с носителем для создания всех трех слоев сосудистой стенки (Ito A. et al., 2005). Дополнительным плюсом является быстрота заселения клеток и воспроизводимость результатов. Не было выявлено никакого вредного воздействия на клетки при малой концентрации частиц, с другой стороны, исследования показали снижение пролиферативной активности при использовании более 100 мкм наночастиц оксида железа на клетку (Ito A. et al., 2005) и более 50 «*dynabeads*» на клетку (Tiwari A. et al., 2003). Кроме того, пока не изучены отдаленные эффекты применения таких частиц и не понятно, что с ними происходит после трансплантации ТИКС и каковы их возможные негативные влияния местного и общего характера (Villalona G. A. et al., 2010).

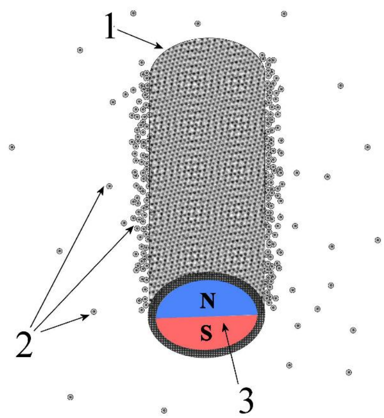


Рисунок 7 - Динамический метод совмещения клеток и носителя: использованием сил магнитного притяжения: 1 – заселяемый носитель; 2 – клетки с магнитными наночастицами; 3 – магнит

Комбинированные способы динамического совмещения клеток с носителем

Для крупнопористых носителей из синтетических ко-полимеров, сочетание сразу нескольких описанных способов воздействия, таких как вращение, разница давлений и другие, несмотря на некоторое усложнение методики внедрения клеток, приводит к лучшим результатам (Sodian R. et al., 2002; Soletti L. et al., 2006).

Одной из таких комбинаций является так называемое «ротационное вакуумное заселение», основанное на описанных ранее принципах для эффективного, автоматизированного и воспроизводимого совмещения клеток и носителя (Soletti L. et al., 2006; Nieponice A. et al., 2008). С помощью специальной канюли через матрикс перфузируется суспензия прогениторных клеток и одновременно вся конструкция вращается вокруг своей продольной оси внутри вакуумной камеры. К преимуществам метода относятся: доставка клеток через всю толщу стенки по всей длине матрикса, воспроизводимость и автоматизация процесса. Авторы говорят о 60-90% эффективности клеточного заселения, и отмечают, что она зависит от размера пор матрикса, а также от скорости перфузии. Лучшие результаты были получены при меньшем размере пор и низкой скорости потока клеточной суспензии (Soletti L. et al., 2006). Недостатком метода можно считать его сложность, а это снижает надёжность технологии. При успешном же применении сочетаются сразу несколько принципов засевания клеток с повышенной эффективностью. Кроме того, в готовом устройстве предусмотрена возможность использования графтов только определенной длины и диаметра (Nieponice A. et al., 2006).

Создание ТИКС с использованием фотополимеризующегося гидрогеля

Известно применение производных фотополимеризующегося полиэтиленгликоля с характеристиками естественного ВКМ для создания ТИКС (Nguyen K. T., West J. L., 2002). Этот полимер не оказывает негативного влияния на клетки и ткани (Mann B. K. et al., 2001; Schmedlen R. H. et al., 2003). Гидрогель, содержащий клетки, заливается в специальную форму и под воздействием ультрафиолета полимеризуется, что позволяет получить однородно заселенный ТИКС (Mann B. K. et al., 2001). Этот подход демонстрирует обнадеживающие результаты в исследованиях *in vitro* в отношении эффективности использования клеток, сохранения их жизнеспособности и пролиферативной активности, несмотря на воздействие ультрафиолета во время процедуры фотополимеризации (Nguyen K. T., West J. L., 2002). Испытания ТИКС, полученных из таких гидрогелей, *in vivo* пока не проведены, поэтому еще предстоит выяснить, сможет ли такая конструкция выдержать артериальное давление и быть устойчивой к тромбообразованию (Villalona G. A. et al., 2010).

1.6 «Безматриксное» изготовление тканеинженерных кровеносных сосудов

Альтернативным подходом является использование только клеточных популяций и

продуцируемого ими в условиях *in vitro* межклеточного матрикса для создания ТИКС. В этом случае, нет необходимости использовать носитель для совмещения с клетками: основу ТИКС формируют сами клетки. Такой метод, обозначаемый в зарубежной литературе «*cell-sheet engineering*» был разработан L'Heureux N. et al. (1993, 1998, 2007). Вместо использования «классического» метода с совмещением клеток и носителя, клетки выращивали в монослое с получением клеточных пластов. Фибробласты кожи человека культивировали на специальной подложке в течение 6–8 нед. для создания богатого коллагеном пласта живых клеток. Полученный пласт 4 раза оборачивали вокруг металлического стержня диаметром 4,75 мм так, чтобы образовалась трубка, которую помещали в питательную среду на 12 нед., в течение которых все слои фибробластов срастались. Далее трубку высушивали на воздухе в течение нескольких часов. Полученный таким образом девитализованный коллагеновый матрикс, выполняющий функцию внутренней мембраны, четырежды оборачивали пластом живых аутологичных ГМК и в течение 8–12 нед. культивировали в питательной среде. За 7 сут. до трансплантации полученный графт заселяли изнутри эндотелиоцитами и прекондиционировали в биореакторе. Преимуществами метода являются равномерное распределение клеток в сосудистой стенке, наличие слоев гладкомышечных и эндотелиальных клеток, высокая механическая прочность. К недостаткам данного подхода относится слишком длительный срок изготовления таких сосудов – от 6 до 9 мес. (в среднем 7,5 мес.), а также высокая стоимость. В настоящее время эта техника используется компанией Cytograft Tissue Engineering (США) и называется *Lifeline* (Рисунок 8). Следует отметить, что в данный момент это единственные тканеинженерные сосуды малого калибра, допущенные Федеральным Агентством США по Контролю за Пищевыми Продуктами и Лекарственными препаратами (*FDA*) к клиническим испытаниям на человеке.

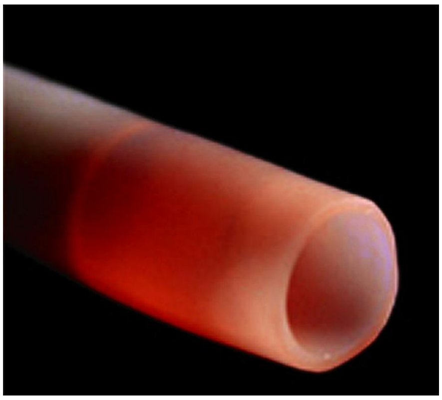


Рисунок 8 - Сосуд, созданный посредством технологии Lifeline™. (http://cytograft.com)

Тем не менее, из-за высокой стоимостью производства (более $15.000) (McAllister T. N. et al., 2008) и длительным сроком ожидания (до 9 месяцев), вряд ли этот способ станет использоваться в клинической практике.

1.7 Тканевая инженерия кровеносных сосудов *in vivo* из грануляционной ткани

Искусственные артерии могут быть получены из грануляционной ткани (Thomas A.C. et al., 2003). В этом случае в качестве «биореактора» используют брюшную или плевральную полость, обладающие большой реактивностью. Метод основан на использовании нормального процесса заживления ран. Давно известно, что вокруг инородных предметов в брюшной полости образуется соединительно-тканная капсула. Campbell J.H. et al. (2000) обратили внимание, что эта капсула состоит из миофибробластов, происходящих из клеток костного мозга, покрытых снаружи мезотелеем. То есть стенка капсулы напоминала стенку кровеносного сосуда с обратным расположением слоев. Мезотелиальные клетки, расположенные на внешней поверхности капсулы, происходили из брюшины и проявляли антитромботические свойства. Campbell J.H. et al. (2000) разработали метод тканевой инженерии кровеносных сосудов *in vivo* из грануляционной ткани реципиента, суть которого заключается в следующем. В брюшную или плевральную полость животного помещали трубку из биосовместимого материала, что вызывало формирование грануляционной ткани вокруг неё. Отмечено, что сращение капсулы с кишечником не происходит. Через 2-3 недели эту трубку удаляли из брюшной полости, снимали капсулу с трубки и выворачивали её наизнанку как чулок так, чтобы наружный слой оказался внутри просвета. Таким образом, получали трубку из живой ткани, похожую на кровеносный сосуд с внутренней выстилкой мезотелеем («интима») и с «медией», состоящей из многих слоев плотно сращенных миофибробластов (гладкомышечных клеток) и коллагенового матрикса. Такие искусственные сосуды были имплантированы в позицию сонной артерии кролика, брюшной аорты крысы, бедренной артерии собаки, то есть тех животных, в брюшной/плевральной полости которых эти кондуиты были выращены (Campbell J.H. et al., 1999, 2000; Chue W.L. et al., 2004). В позиции артерии эти трубки под воздействием местных факторов, перестраивались в структуру, похожую на кровеносный сосуд. Стенка утолщалась, количество клеток увеличивалось. Через 6 недель эти сосуды реагировали на вещества, вызывающие вазоконстрикцию. К 3-4 месяцам стенка искусственных артерий под действием высокого давления в два раза утолщалась, появлялась «адвентиция», содержащая *vasa vasorum* на наружной поверхности. Миофибробласты дифференцировались в гладко-мышечные клетки, не сильно отличающиеся от клеток рядом расположенных артерий. В связи с тем, что эти сосуды выращиваются в теле реципиента полностью из собственных клеток, они не вызывают никакой иммунологической реакции после трансплантации. Можно получить любой размер и диаметр сосуда благодаря тому, что ткань формируется вокруг трубки. К недостаткам этого метода, однако, относится то, что для получения искусственного сосуда требуется две дополнительные хирургические операции со вскрытием брюшной или плевральной полости (Thomas A.C. et al., 2003).

1.8 Использование биореакторов в тканевой инженерии кровеносных сосудов малого калибра

В физиологических условиях перенос кислорода и питательных веществ к тканям и выведение продуктов обмена из тканей осуществляется через систему капилляров. Трехмерные клеточные конструкции, синтезированные *ex vivo*, не имеют сосудистой сети, представленной в нативных тканях (за исключением созданных на основе децеллюляризованного органа) (Ott H. C. et al., 2008). Поэтому обмен питательными веществами, газами происходит только за счёт диффузии. В статических условиях, когда смешивания среды не происходит, формируются большие градиенты концентрации между окружающей средой клеточными конструкциями. Таким образом, клетки в центре матрикса получают меньше питательных веществ, чем необходимо, устранение же продуктов обмена происходит очень медленно, что в конце концов приводит к гибели клеток. Транспорт кислорода считается основным лимитирующим фактором обмена веществ при культивировании клеточных культур (Shachar M., Cohen S., 2003; Wang X., 2012). Кроме того, давно известно, что механические сигналы регулируют развитие нормальных тканей. Успешный процесс получения кровеносных сосудов посредством тканевой инженерии напрямую связан с необходимостью применения механических стимулов. Организация, состав и функция сосудов может подвергаться регуляции посредством изменения физиологических режимов циклического растяжения, напряжения сдвига, давления на сосудистую стенку и т. п. (Pei M. et al., 2002). Возможность биореакторов модулировать физиологический поток и параметры давления является определяющей для оптимизации клеточно-клеточных и клеточно-матриксных взаимодействий, ведущих к экспрессии тех же генов, что и в условиях *in vivo* (Chester A.H., 2014).

Термин «биореактор» в контексте тканевой инженерии кровеносных сосудов может быть определен как устройство, способное воспроизвести биологические и физиологические условия сердечно-сосудистой системы (Lyons E., Pandit A., 2005). Функциональные биореакторы должны поддерживать жизнеспособность тканей, модулируя как механические, так и биохимические условия. Идеальная конструкция биореактора должна позволять контролировать условия физико-химического окружения (pO_2, pH, pCO_2), обеспечивать асептические условия для питания и развития тканей и оптимизировать условия для увеличения репродукции клеток (Shachar M., Cohen S., 2003). Применение биореактора направлено также на прекондиционирование заселенного клетками графта перед трансплантацией с позиций подготовки его к условиям, в которых он будет находится *in vivo* (Pei M. et al., 2002).

Описанные в литературе биореакторы построены по общему принципу: в камере биореактора находится 1 или несколько культивируемых сосудистых кондуитов, через который перфузируется культуральная среда с помощью перистальтического насоса из специальной

емкости по замкнутому кругу (Рисунок 9). Все компоненты биореактора, как правило, находятся в CO_2-инкубаторе для обеспечения необходимого газового состава среды и температурных условий (Lyons, Pandit 2005).

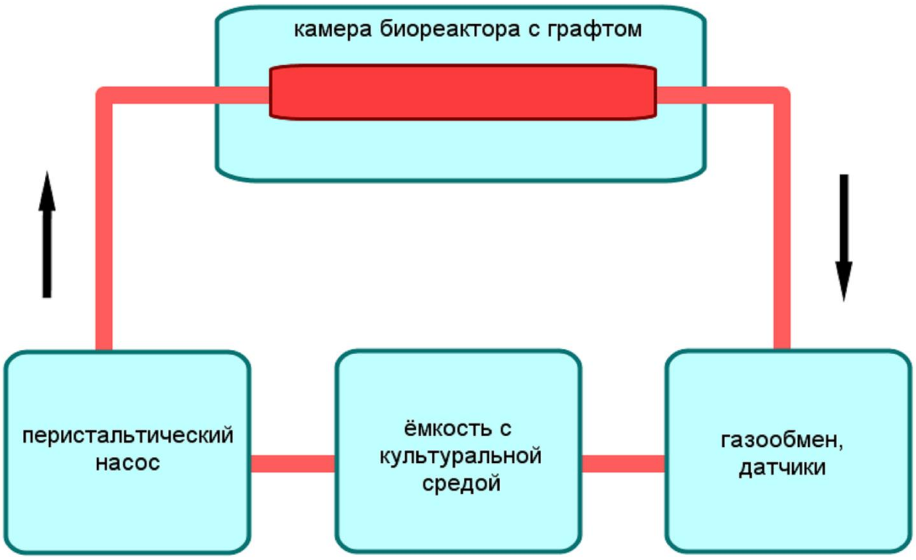


Рисунок 9 - Принципиальная схема биореактора для создания условий, необходимых при культивировании тканеинженерных кровеносных сосудов.

Из необычных моделей стоит отметить предложенный Geeslin M.G. et al. (2011) сложный двухконтурный биореактор. Его устройство позволяло вращать камеру с графтом и осуществлять раздельную перфузию культивируемого сосудистого кондуита через его просвет и по наружной поверхности. Этим достигалось улучшение пролиферации не только эндотелиальных клеток на внутренней поверхности тканеинженерного сосуда, но и ГМК на его внешней стороне.

Помимо этого, существует большое число работ, в которых биореактор *in vitro* не использовался, а засеянные клетками матриксы напрямую имплантировались в кровеносное русло животного-реципиента, организм которого выполнял роль биореактора *in vivo* для ремоделирования ТИКС в зрелый кровеносный сосуд (Cho S.-W. et al., 2005; Roh J.D. et al., 2007; Nelson G.N. et al., 2008; Gui L. et al., 2009; He W. et al., 2010; Nieponice A. et al., 2010; Zhao Y. et al, 2010).

1.9 Заключение

Стремительное развитие сердечно-сосудистой хирургии выявило очевидный в настоящее время дефицит сосудистых протезов малого диаметра. Изготовление искусственных сосудов со свойствами нативной артерии многими до сих пор считается утопией. Решением данной проблемы может стать тканевая инженерия кровеносных сосудов, быстро развивающаяся в последнее десятилетие. ТИКС, как ожидается, будут отвечать всем требованиям, предъявляемым в настоящее время к сосудистым заменителям.

Во многих странах мира активно ведутся поиски лучшего материала для создания основы ТИКС, выбор оптимального клеточного субстрата и способа его доставки на носитель. Обращает на себя внимание отсутствие отечественных работ, посвященных данной тематике.

Исследования в области тканевой инженерии кровеносных сосудов сфокусированы на производстве биодеградируемых носителей и методиках заселения их жизнеспособными клетками. Было предложено множество материалов для создания основы графтов – ПГК, полимолочная кислота, гидрогели, коллагеновые пласты, грануляционная ткань и децеллюляризованные сосуды.

Привлекательной выглядит идея использования децеллюляризованных сосудов в связи с естественной структурой ВКМ, оптимальными механическими характеристиками, минимальной иммуногенностью, а также с благоприятными, естественными условиями для роста клеток реципиента. Недостатком применения децеллюляризованных тканей является необходимость поиска донорских сосудов. Gui L. et. al. (2009) предложили использовать артерии пуповины человека в качестве основы для изготовления тканеинженерного сосуда. Авторы изучили строение децеллюляризованных артерий пуповины и их проходимость при имплантации в аорту крысы, которая составила 54% через 8 недель. Также была доказана возможность роста *HUVEC* на внутренней поверхности децеллюляризованных артерий. К сожалению, дальнейшего развития эта идея не получила. Возможно, предварительное заселение эндотелиальными или прогениторными клетками до имплантации повысило бы проходимость графтов. Других работ, с использованием артерий пуповины в доступной литературе мы не обнаружили. Тем не менее, нам представляется использование этого материала крайне перспективным. Прежде всего, пуповина легко доступна и её получение не создает этических проблем, так как чаще всего она утилизируется. Кроме того, при родоразрешении кесаревым сечением, пуповина может быть получена в стерильном виде. Длина пуповины составляет 40-60 см, и, соответственно, обе артерии проходящие в ней, могут быть выделены на этом протяжении. У АП нет боковых ветвей, она имеет одинаковый диаметр на всем протяжении, который при физиологическом давлении (после выделения) составляет 3,5-4,5 мм, что подходит для большинства клинических ситуаций, например, создания тканеинженерных аутологичных сосудов необходимых при аорто-коронарном или бедренно-подколенном шунтировании.

Открытым остается вопрос выбора оптимальной методики децеллюляризации, которые сильно отличаются в зависимости от вида обрабатываемого сосуда. При отработке новой методики децеллюляризации необходимо уделить внимание не только полноте удаления клеточного дебриса из сосудистой стенки, но и сохранности ВКМ, следует провести анализ механических свойств материала.

Обсуждается выбор типа (или нескольких типов) клеток, оптимальных для заселения

матрикса при изготовлении ТИКС. Доказано, что наличие эндотелиоцитов на внутренней поверхности носителя снижает его тромбогенность. Использование ГМК позволяет получить ТИКС, по своей структуре максимально похожий на нормальную артерию, но безусловная их потребность в составе графта не доказана. Многообещающим выглядит предложение использовать прогениторные клетки для заселения ТИКС, из которых наиболее широко используются МСК. Доказано, что они обладают некоторой антитромбогенной активностью (Hashi C.K. et al., 2007), однако их дальнейшая судьба после заселения, их роль и влияние на ремоделирование ТИКС пока до конца не изучены.

Ключевым этапом в разработке ТИКС является совмещение клеток и их носителя и этому посвящены многие исследования. Способ заселения влияет не просто на количество клеток, изначально прикрепившихся к матриксу, но и на качество ткани, получаемой при дальнейшем культивировании.

Вариант клеточного заселения зависит от типа используемых клеток и видов носителей. Рутинно использующийся статичный метод значительно уступает динамическим способам совмещения, при которых повышается не только число иммобилизованных клеток, но и однородность их распределения в матриксе. Применяемые многими авторами различные модели биореакторов способны улучшить результаты рецеллюляризации сосудистого кондуита.

Испытания тканеинженерных сосудов на животных, демонстрируют многообещающие результаты. Однако надо отметить отсутствие ТИКС малого калибра, которые можно было бы использовать в клинической практике. В то же время создается впечатление, что применение таких сосудистых заменителей нового поколения для использования в клинике - перспектива ближайшего будущего.

Таким образом, для разработки способа создания кровеносного сосуда малого калибра методами тканевой инженерии необходимо решить несколько задач. Во-первых, разработать основу будущего сосуда. С этой точки зрения наиболее подходящей методикой представляется децеллюляризация донорской артерии, однако надёжный способ удаления клеток из сосудистой стенки ещё предстоит разработать и изучить его эффективность. Во-вторых, не ясно, как меняется прочность децеллюляризованных сосудов, следовательно, необходимо также оценить механические свойства ВКМ. В-третьих, предстоит исследовать заселение клеток на матрикс, подобрать оптимальные условия для рецеллюляризации. Наконец, полученный ТИКС необходимо изучить в эксперименте *in vivo*.

Тканевая инженерия кровеносных сосудов представляется новым, актуальным, востребованным и перспективным направлением в науке, которое находится на стыке различных специальностей – физиологии, гистологии, клеточной биологии и сердечно-сосудистой хирургии.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Создание основы тканеинженерного сосуда (носителя клеток) методом децеллюляризации артерии пуповины человека

2.1.1 Получение материала

В качестве основы тканеинженерного сосуда малого калибра использовали артерию пуповины (АП) человека. Материал получали в родильном зале Федерального специализированного перинатального центра ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» (Санкт-Петербург, Россия). Все роженицы до родов подписывали развернутое информированное согласие на использование предназначенного для утилизации фрагмента пупочного канатика в научно-исследовательских целях. Пуповину транспортировали в лабораторию в фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБ, Росмедбио, Россия) при температуре +4 ^{o}C. Время доставки составило 1-2 ч. Стандартными хирургическими инструментами (пинцет, ножницы) из пуповины выделяли обе артерии, которые затем разделяли на участки длиной 5 см. Всего в ходе работы исследовано более 200 фрагментов АП.

2.1.2 Поиск эффективного способа децеллюляризации артерий пуповины

На основании анализа литературы были выбраны и апробированы несколько способов децеллюляризации кровеносных сосудов, которые описаны авторами как эффективные.

Способ 1 применен Liu G.F. et al. (2008) для децеллюляризации нисходящей аорты эмбрионов поросят. Следуя описанному протоколу, фрагменты АП обрабатывали 0,1% раствором трипсина (Самсон-Мед, Россия) в ФСБ с 0,02 % этилендиаминтетраацетата (ФСБ-ЭДТА, Росмедбио, Россия) в течение 36 ч. Раствор меняли каждые 12 ч. Затем артерии инкубировали в течение 4 ч. с нуклеазами (РНКаза А 20мкг/мл, ДНКаза I 200мкг/мл, Росмедбио, Россия), после этого децеллюляризованную артерию пуповины (ДАП) несколько раз отмывали в ФСБ. Все действия выполняли при температуре 37 ^{o}C.

Способ 2 подробно описан Amiel G.E. et al. (2006) для децеллюляризации аорты свиньи. Согласно протоколу, на первом этапе фрагменты АП погружали в дистиллированную воду на 24 ч. при температуре +4 ^{o}C, затем на 1 ч. в 0,05 % раствор трипсина в ФСБ-ЭДТА. После этого инкубировали в течение 24 ч. с питательной средой α-MEM (ПанЭко, Россия) с 5 % фетальной бычьей сыворотки (Hyclone, США). Далее обрабатывали образцы 1 % раствором тритон Х-100 (Amresco, США) с добавлением 0,1 % гидрохлорида аммония (Ватхэм-Фармация, Россия) на протяжении 3 сут. при температуре +4 ^{o}C и в условиях постоянного перемешивании раствора с помощью орбитального шейкера (GFL 3005, GFL, Германия). Затем ДАП отмывали

дистиллированной водой и ФСБ по 24 ч при температуре +4 ^{o}С.

Способ 3 был изначально опубликован и запатентован Егоровой М.В. с соавт. (2011). Авторы в качестве субстрата использовали брюшную аорту крысы и фрагменты внутренней грудной артерии человека. Нами эта методика апробирована для АП, которые канюлировали и перфузировали через просвет с помощью перистальтического насоса Gilson MiniPulse 3 (Gilson, США) при комнатной температуре растворами детергентов по 1 ч. со скоростью 20 мл/мин сначала 1 % раствором додецилсульфата натрия (Amresco, США), затем 1 % раствором тритон X-100 (Amresco, США).

Способ 4 предложили Böer U. et al. (2011) для децеллюляризации сонных артерий лошадей. При использовани этого метода АП освобождали от крови в физрастворе, затем переносили в раствор детергентов, содержащий 0,5 % додецилсульфата натрия (Amresco, США) и 0,5 % дезоксихолата натрия (Sigma, США) на 48 ч. После отмывания сосудов в дистиллированной воде, а затем в физрастворе, их обрабатывали нуклеазами (РНКаза А 20мкг/мл, ДНКаза I 200мкг/мл, Росмедбио, Россия) в течение 24 ч. при 37 ^{o}С.

Способ 5, примененный Daniel J.et al. (2005) для децеллюляризации вен пуповины, был также апробирован нами. АП обрабатывали в течение 12 ч. сначала 1% раствором додецилсульфата натрия (Amresco, США), затем, после 15-минутного отмывания в ФСБ, 75% этанолом (Ферейн, Россия).

Способ 6, описанный Smith A.N. (2011) для сонных артерий свиней, заключался в обработке сосудов 0,075 % раствором додецилсульфата натрия (Amresco, США) в течение 22 ч. на орбитальном шейкере (GFL 3005, GFL, Германия) с последующим трехкратным по 15 мин. отмыванием в ФСБ.

По каждому протоколу (способы №1-6) было обработано 3 фрагмента АП, соответсвенно всего было изготовлено и изучено 18 фрагментов АП (48 гистологических препаратов). Порядок оценки эффективности децеллюляризации был следующий: поперечные срезы образцов окрашивали гематоксилином и эозином и по Ван-Гизону с эластикой (подробнее см. п.2.2.2). При отсутствии видимых клеток в сосудистой стенке и сохранности ВКМ, проводили ИГХ исследования (подробнее см. п.2.2.3). Так как ни один из перечисленных способов не привел к полной элиминации клеточного дебриса из АП по результатам ИГХ, дальнейшие исследования (содержание нуклеиновых кислот, механические свойства) сосудов, обработанных этими методами, не проводили.

2.1.3 Оригинальная методика децеллюляризации артерий пуповины

Неудовлетворенность результатами исследованных способов децеллюляризации (см. раздел результаты, п.3.2) и анализ возможных приемов для их улучшения эмпирическим путем

привел к созданию собственной методики.

Разработанный способ удаления клеток из стенки кровеносных сосудов состоит из несколько этапов со сменой децеллюляризирующих растворов, в составе которых используются детергенты и ферменты. После каждого этапа участок артерии трижды промывали в ФСБ-ЭДТА по 10-15 мин.

Все этапы децеллюляризации проводили при постоянном вращательном движении рабочих растворов в емкости, для чего последнюю устанавливали на орбитальном шейкере (скорость 30 об./мин, амплитуда движений 10 мм; орбитальный шейкер GFL 3005, GFL, Германия). Для глубокого проникновения децеллюляризирующих растворов в толщу сосудистой стенки и максимального удаления клеточных элементов, рабочую емкость подвергали вибрации, с помощью небольшого мотора с эксцентриком (вибромотор QX-6A-1, QX Motor, Китай).

На первом этапе отмывали фрагмент кровеносного сосуда от крови в деионизированной воде (Milli-Q, Millipore, США) в течение 1 ч. при температуре +5 ^{o}C. Затем его помещали на 1 ч. при температуре 37 ^{o}C в 0,05 % раствор трипсина (Самсон-Мед, Россия) в ФСБ-ЭДТА. Далее артерии обрабатывали в течение 22 ч. при комнатной температуре в 0,075 % растворе додецилсульфата натрия (Amresco, США) в ФСБ-ЭДТА, затем в течение 22 ч. также при комнатной температуре обрабатывали 0,25 % раствором тритон X-100 (Amresco, США) в ФСБ-ЭДТА. На последнем этапе, в течение 6 ч. при температуре +37 ^{o}C материал подвергали воздействию нуклеаз (РНКаза А 20мкг/мл, ДНКаза I 200мкг/мл, Росмедбио, Россия) в питательной среде M199 (Sigma-Aldrich, США). ДАП пятикратно отмывали в большом количестве ФСБ и подвергали необходимым исследованиям.

2.2 Морфологическое исследование децеллюляризованных артерий пуповины

2.2.1 Изготовление микропрепаратов артерий для гистологического и иммуногистохимического исследования

Участки исследуемых артерий помещали в 4% забуференный формалин на 4 ч. (при нулевом давлении и без растяжения), дегидратировали в растворах этилового спирта восходящей концентрации и заливали в парафиновые блоки по стандартной программе на автоматическом тканевом процессоре Leica TP 1020 (Leica, Германия). С помощью микротома делали серии из трех поперечных срезов артерий толщиной 5-10 мкм. Для определения равномерности проведённой децеллюляризации исследовали срезы, сделанные по краям и в центре препарата (Рисунок *10*).

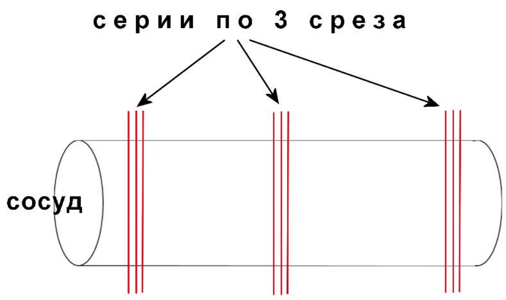


Рисунок 10 - Схема приготовления микросрезов исследуемой артерии.

2.2.2 Гистологическое исследование децеллюляризованных артерий пуповины

Приготовленные срезы депарафинировали в ксилоле и проводили в растворах этилового спирта нисходящей концентрации. Затем образцы стандартно окрашивали гематоксилином и эозином (Dako, Дания) для общей оценки препарата и визуализации ядер клеток. Для определения сохранности ВКМ, срезы окрашивали по Ван-Гизону с эластикой.

Анализ микропрепаратов проводили с помощью светового микроскопа Leica DM1000 с фотокамерой с увеличением от x10 до x1000 (Leica, Германия). Изображения оцифровывали с помощью прилагаемого программного обеспечения Leica Application Suite V 4.5.0.

2.2.3 Иммуногистохимическое исследование децеллюляризованных артерий пуповины

Препараты, в которых при гистологическом исследовании не обнаруживали следов клеток, а ВКМ оставался интактным, подвергали ИГХ анализу, используя непрямой двойной метод визуализации EnVision согласно протоколу производителя (EnVision Detection Systems Peroxidase/DAB Rabbit/Mouse Kit, Dako, Дания). В качестве первичных антител использовали моноклональные антитела к антигенам CD31 (PECAM-1) и к альфа-гладкомышечному актину (α-SMA) (Dako, Дания). Схема приготовления ИГХ-препаратов сводилась к следующим этапам:

- Депарафинизация парафиновых срезов в ксилоле (2 раза по 3 мин.), абсолютном спирте (2 раза по 3 мин.), 96^o этиловом спирте (2 раза по 3 мин.). Для этапа депарафинизации срезы помещали в термостат с температурой 56 ^{o}C на 30 мин.;
- Блокирование активности эндогенной периксидазы в 3% растворе перикиси водорода на метаноле (20 мин. при 6 ^{o}C);
- Промывание в дистиллированной воде (3 мин.);
- Восстановление активности антигенов путем кипячения в ЭДТА (pH 9,0) или в цитратном буфере (pH 6,0) при повышенном давлении в скороварке (4 мин. после достижения максимального давления) с остужением скороварки под проточной водой;
- Промывание в трис-буфере с Tween 20 (2 раза по 5 мин.);
- Инкубация с бычьей сывороткой в контейнере с влажной фильтровальной бумагой (при

комнатной температуре 20 мин.);

- Инкубация с первичными антителами (18 ч., при 6 ^{o}C). Промывание в трис-буфере с Tween 20 (2 раза по 5 мин.);
- Инкубация с EnVision Mouse или EnVision Rabbit (30 мин. при 37 ^{o}C). Промывание в трис-буфере с Tween 20 (2 раза по 5 мин.);
- Реакция с DAB (3-5 мин., под контролем микроскопа, комнатная температура). Рабочий раствор DAB готовился путем добавления к 1 мл буфера 1 капли концентрированного хромогена, согласно инструкции;
- Смывание хромогена дистиллированной водой, промывание в дистиллированной воде (3 мин.);
- Докрашивание ядер гематоксилином (2 мин.). Подсинивание в теплой проточной воде (под контролем микроскопа);
- Обезвоживание: 96^{o} спирт. (2 раза по 2 мин.), карбол – ксилол (2 раза по 2 мин.), ксилол (2 раза по 2 мин.);
- Заключение в бальзам.

Анализ микропрепаратов проводили с помощью светового микроскопа Leica DM1000 с фотокамерой с увеличением от х10 до х1000 (Leica, Германия). Изображения оцифровывали с помощью прилагаемого программного обеспечения Leica Application Suite V 4.5.0.

2.3 Определение содержания и состава нуклеиновых кислот в децеллюляризованных артериях

2.3.1 Окрашивание децеллюляризованных артерий DAPI

Здесь и далее под децеллюляризованными артериями (ДАП) подразумеваются АП, обработанные по оригинальному способу. Сосуды, обработанные другими способами, дальнейшим исследованиям не подвергали в связи с неудовлетворительными результатами гистологических и ИГХ исследований (см. раздел результаты, п.3.2).

Для визуального определения нуклеиновых кислот в образцах тканей использовали окраску DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид), высокотропную к ДНК и РНК.

Фрагменты нативных АП (n=3) и ДАП (n=5) отмывали дважды в ФСБ по 5 мин., затем помещали в раствор DAPI (1 мг/мл, Life Technologies, США) на 20 мин. при комнатной температуре. После этого образцы отмывали 10 мин. в ФСБ и 10 мин. в деионизированной воде. Затем исследуемые артерии ножницами рассекали вдоль и распластывали на предметном стекле внутренней стороной вниз. Анализ препаратов проводили с помощью светового микроскопа Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss, Германия) с флуоресцентной лампой и фотокамерой Powershot (Canon, Япония) при увеличении от х100 до х200 (Leica, Германия).

2.3.2 Определение содержания ДНК в децеллюляризованных артериях

Исследовали 3 фрагмента ДАП, фрагмент нативной АП в качестве положительного контроля, и ФСБ в качестве отрицательного контроля. Для экстракции ДНК фрагменты исследуемых артерий массой 250-300 мг гомогенизировали в аппарате TissueLyser (QIAGEN, США). Выделение ДНК из гомогенизата проводили с помощью набора QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, США) согласно протоколу производителя. Количественный анализ ДНК проводили на спектрофотометре NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, США).

2.3.3 Определение содержания и сохранности РНК в децеллюляризованных артериях

Исследовали 3 фрагмента ДАП, фрагмент нативной АП в качестве положительного контроля и ФСБ в качестве отрицательного контроля. Для экстракции РНК, фрагменты исследуемых артерий массой 100-120 мг гомогенизировали с тризолом (Ambion, США) в аппарате TissueLyser (QIAGEN, США). После хлороформенной экстракции, РНК преципитировали изопропанолом из водной фазы, отмывали 75% этанолом и сушили воздухом при комнатной температуре. После растворения РНК в чистой воде, проводили количественный анализ на спектрофотометре NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, США), и качественный анализ на анализаторе BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies, США), с использованием системы RNA nano chip (Agilent Technologies, США).

2.4 Хранение децеллюляризованных артерий

2.4.1 Криоконсервация децеллюляризованных артерий

ДАП помещали в криовиалы (Nunc, США), замораживали и хранили при -80 ^{o}C от 1 до 3 мес. (n=25). В качестве криопротектора использовали ФСБ с 10 % диметилсульфоксидом (Sigma, США). Непосредственно перед дальнейшим использованием ДАП размораживали на водяной бане при 37 ^{o}C и отмывали ФСБ с трехкратной сменой раствора.

2.4.2 Хранение децеллюляризованных артерий без замораживания

ДАП хранили в 15 мл полипропиленовых пробирках типа Falcon (Sarsted, Германия; Orange scientific, Бельгия), в стерильном ФСБ с добавлением антибиотиков (100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, Gibco, США), при температуре +4^{o}C.

2.5 Изучение механических свойств артерий пуповины человека до и после децеллюляризации

2.5.1 Группы исследования

Для определения механических свойств были сформированы 4 группы исследования:

I группа (контроль) - нативные АП;

II группа – ДАП;

III группа - ДАП, после хранения в течение 10 мес. (без замораживания);

IV группа — криоконсервированные ДАП.

2.5.2 Оценка механической прочности децеллюляризованных артерий пуповины человека

Определение механической прочности АП проводили путем заполнения жидкостью кровеносного сосуда до его разрыва (n=10 в каждой группе). Для проведения испытания один конец исследуемой артерии длиной 4 см перевязывали нитью (нуролон 2-0, Ethicon, США), а на втором конце фиксировали металлическую канюлю, которую с помощью ПВХ трубок и тройников подсоединяли к 20-мл шприцу (BBraun Melsungen, Германия), заполненному физиологическим раствором, и к аналоговому манометру (Росма, Россия) для регистрации давления. Артерию погружали в емкость с водой комнатной температуры. С помощью шприца повышали давление в системе со скоростью 10 мл/с до разрушения образца. С помощью цифровой видеокамеры HC-V210 (Panasonic, Япония) регистрировали максимальное (пиковое) давление. Сравнивали результаты для четырех групп сосудистых кондуитов.

В связи со значительным снижением механической прочности криоконсервированных артерий (IV группа, см. раздел результаты, п.3.6), дальнейшие исследование их механических свойств не проводилось.

2.5.3 Изучение упруго-эластических свойств децеллюляризованных артерий пуповины человека

Испытание проводили на универсальной разрывной машине Instron 5543 (Instron, США) (Рисунок 11). Участок артерии длиной 5 см в расслабленном состоянии фиксировали в рабочих захватах аппарата так, чтобы начальное расстояние между захватами было 3-3,5 см. Проводили преднатяжение измеряемого образца до нагрузки 0,05 Н (Н – Ньютон) измеряли исходную длину (L_0, мм) и обнуляли показатели аппарата. Затем с постоянной скоростью 1 мм/сек испытуемый образец растягивали до его разрушения.

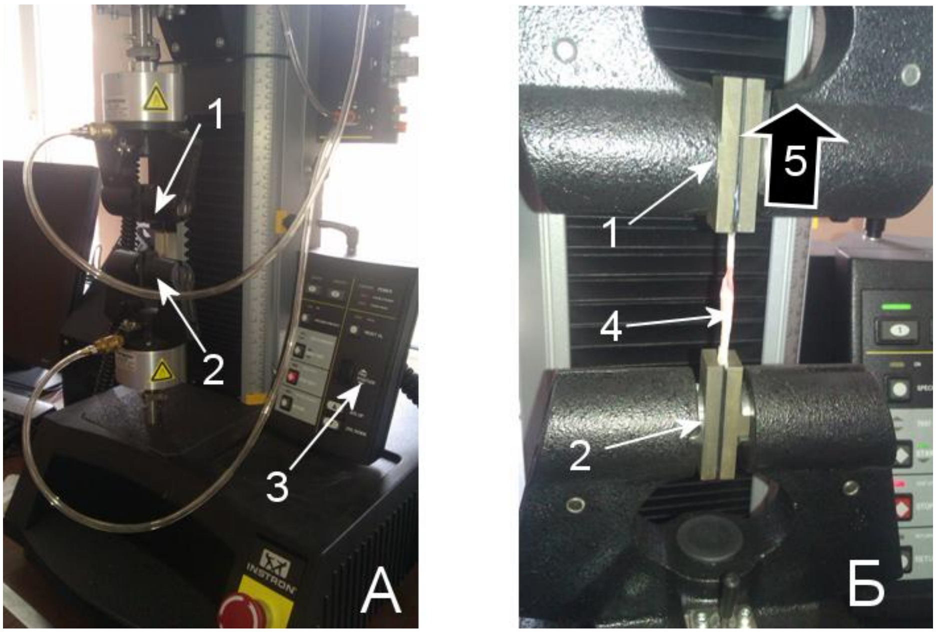


Рисунок 11 - Разрывная машина Instron 5543 (Instron, США). А – внешний вид; Б – испытание на растяжение артерии в продольном направлении. 1- движущийся захват, 2 – стационарный захват, 3 – пуль управления, 4 – фрагмент исследуемой артерии, 5 – направление растяжения

Во время проведения испытаний аппарат измерял удельную силу, прилагаемую к образцам (нагрузка, Н), необходимую для их растяжения. Деформация сосуда – изменение длины образца относительно исходной (ΔL, %) – рассчитывалась по формуле:

$$\Delta L = \left(\frac{L}{L_0} - 1\right) \times 100\% \quad , \qquad (1)$$

где L – текущая длина испытуемого сосуда, мм.

Для измерения растяжимости в поперечной плоскости, артерию разрезали скальпелем, так чтобы получились кольца шириной 2 мм. Их надевали на 2 самодельных П-образных крючка (сформированы из обычной канцелярской скрепки), которые фиксировались в зажимах разрывной машины. Проводили преднатяжение до нагрузки 0,05 Н, измеряли расстояние между П-образными крючками (L_0, мм) и обнуляли показатели аппарата. После этого с постоянной скоростью 1 мм/сек образец растягивали до его разрушения.. Деформацию рассчитывали по формуле (1).

Результаты обоих исследований регистрировали и обрабатывали на компьютере с помощью прилагаемого программного обеспечения Bluehill2 (Instron, США).

2.5.4 Устойчивость к прорезыванию шовным материалом

Участки артерий длиной 2,5 см фиксировали в неподвижном захвате разрывной машины Instron 5543 (Instron, США), с противоположной стороны сосуд однократно прошивали полипропиленовой нитью (пролен 5-0, Ethicon, США), отступая 2 мм от его края. Нить

фиксировали в подвижном захвате и производили растяжение с постоянной скоростью 1 мм/с (Рисунок 12). Измеряли усилие, необходимое для вытягивания нити сквозь стенку артерии, которое характеризовало устойчивость ткани к прорезыванию шовным материалом (Н). Результаты регистрировались на компьютере с помощью программного обеспечения Bluehill2 (Instron, США).

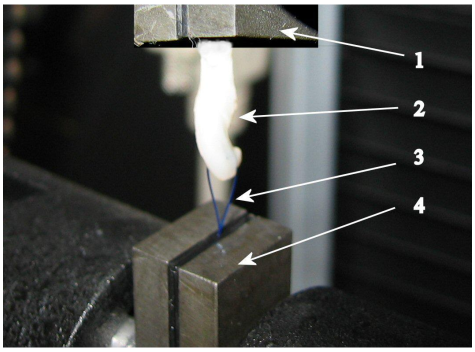


Рисунок 12 - Исследование устойчивости децеллюляризованных артерий к прорезыванию шовным материалом. 1 – Верхний захват, движущийся; 2 – участок децеллюляризованной артерии; 3 – нить "Prolene" 5/0; 4 – нижний захват, неподвижный.

2.5.5 Определение площади поперечного сечения и толщины сосудистой стенки

Для определения размеров стенки артерий фотографии микропрепаратов (сделанных при увеличении x40) обрабатывали в программе для анализа изображений ImageJ (версия 1.47, National Institutes of Health), калибровали масштаб, измеряли наружный и внутренний диаметр сосуда, рассчитывали толщину сосудистой стенки. Вручную обводили наружный и внутренний контуры сосудистой стенки, после чего автоматически рассчитывалась площадь поперечного сечения стенки сосуда (S, мм^2) по формуле:

$$S = S_{внешн.} - S_{внутр.}\ , \qquad (2)$$

где S- площадь поперечного сечения стенки сосуда;

$S_{внешн.}$ – площадь по внешнему контуру;

$S_{внутр.}$ – площадь по внутреннему контуру.

Для дальнейших вычислений было использовано среднее значение для трех препаратов каждой группы.

2.6 Тест на стерильность децеллюляризованных сосудистых кондуитов

Фрагменты ДАП массой 0,5±0,1г помещали в прозрачные стеклянные пробирки (n=4) со стерильной тиогликолевой питательной средой (ОАО «Биомед им. И.И. Мечникова», Россия). Отрицательным контролем служила такая же пробирка с добавлением 1 мл стерильного ФСБ (n=2). В качестве положительного контроля использовали фрагменты нативной АП (n=4). Материал инкубировали в течение 7 сут. в термостате (Binder, Германия) при +37 ^{o}C. Оценку

среды проводили визуально: её помутнение, изменения цвета, появление хлопьев, осадка или запаха свидетельствовало о бактериальной контаминации.

2.7 Посев клеток на децеллюляризованные артерии пуповины (рецеллюляризация)

2.7.1 Культуральная среда и условия культивирования

Для культивирования клеток и проведения экспериментов по рецеллюляризации, использовали питательную среду α-MEM (ПанЭко, Россия) с 10 % фетальной бычьей сывороткой (Hyclone, США), 1 % глутамина (Invitrogen, США) и 1 % смесью пенициллина и стрептомицина (Invitrogen, США) без добавления факторов роста.

Культивирование клеток и рецеллюляризацию сосудистых кондуитов проводили в лабораторном CO_2-инкубаторе ShelLab (Sheldon Manufacturing, США) при 5 % содержании CO_2 и температуре 37 ^{o}C.

2.7.2 Выделение и экспансия мезенхимных стволовых клеток

Первичную культуру МСК костного мозга (МСК КМ) и жировой ткани (МСК ЖТ) взрослых крыс получали согласно традиционной методике селекции по адгезии к пластику (Dmitrieva et al., 2012). Для этого была использована одна взрослая белая лабораторная крыса линии Вистар массой 255 г, самец. Обращение с животным соответствовало правилам Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Страсбург, 1986), проведение исследования было одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова».

Эвтаназия животного проводилась интраперитонеальным введением летальной дозы хлоралгидрата из расчёта 1,2 г/кг массы тела. В асептических условиях выделяли бедренные кости, ножницами отсекали эпифизы. Костный мозг из диафизов костей вымывали ФСБ с помощью шприца на пластиковые чашки Петри (Sarstedt, Германия). Добавляли полную питательную среду и переносили чашки в CO_2-инкубатор (пассаж P_0). Кроме того выделяли 0,3-0,5 мл жировой ткани из забрюшинного пространства. Жировую ткань в чашке Петри механически гомогенезировали, затем проводили энзиматическую диссоциацию клеток коллагеназой III (Worthington, США) в концентрации 1000 Ед/мл в течение 30 мин при 37 ^{o}C. После нейтрализации действия коллагеназы полной питательной средой, все клетки помещали в культуральные флаконы и выращивали аналогично условиям, при которых культивировали МСК КМ.

Через 48 ч неадгезивные клетки, форменные элементы крови и соединительно-тканную строму удаляли двукратной отмывкой ФСБ. Замену 50 % питательной среды проводили через 1

сутки. На 7 день клетки мобилизовали 0,05 % раствором трипсина (Invitrogen, США) и проводили пересев (пассаж P_1). В дальнейшем культивирование МСК проводили в культуральных плашках площадью 25 и 75 см^2 (Sigma, США) до достижения субконфлюентности монослоя перед каждым пасссажем. Для проведения рецеллюляризации использовали клетки 3-8 пассажей.

2.7.3 Определение эффективности клеточного засевания и оптимальной плотности посева децеллюляризованных артерий пуповины

Перед началом экспериментов по рецеллюляризации сосудистых кондутитов необходимо было сначала оценить исходное количество МСК на единицу длины ДАП, то есть определить оптимальную плотность посева. Для этого использовали суспензию МСК КМ в различной концентрации : 1x10^5, 5x10^5, 1x10^6, 2x10^6, 3x10^6 / 100 мкл, которой заполняли просвет ДАП (длиной 5 см, по 3 образца для каждой из 5 концентраций, всего n=15). Один конец ДАП лигировали шелковой нитью (Mersilk 2-0, W327, Ethicon, США), а с другой стороны с помощью пипетки в просвет вводили 100 мкл клеточной суспензии, содержащей различное количество МСК КМ, после чего лигировали ДАП с другой стороны.

Через 1 ч. инкубирования аккуратно промывали засеянные графты 10 мл ФСБ. Клетки в промывном растворе осаждали центрифугированием и считали в гемоцитометре ($N_{ост.}$). В качестве контроля разбавляли 100 мкл суспензии (1x10^6 кл.) 10 мл ФСБ, с аналогичным осаждением и подсчётом. Отношение исходного количества клеток (1x10^6) в контроле к полученному ($N_{контр.}$) принимали за поправочный коэффициент (k) :

$$k = \frac{10^6}{Nконтр} \tag{3}$$

Количество адгезированных на ДАП клеток ($N_{адг}$) принимали равным разнице исходного числа клеток к полученному при подсчёте клеток в промывном растворе, умноженному на поправочный коэффициент :

$$Nадг = Nисх - Nост \times k \tag{4}$$

Эффективность клеточного использования определяли как соотношение числа клеток, адгезированных на ДАП, к исходному количеству клеток умноженному на 100% :

$$эффективность = \frac{Nадг}{Nисх} \times 100\% \tag{5}$$

Оптимальную плотность посева ДАП рассчитывали, исходя из оптимального исходного числа клеток на единицу длины сосуда :

$$оптимальная\ плотность\ посева = \frac{Nисх}{5\ см} \tag{6}$$

2.7.4 Отработка различных вариантов улучшения доставки клеток на носитель

ДАП заполняли 100 мкл клеточной суспензии, содержащей 1х10^6 МСК КМ, как описано выше (п.2.7.3).

Далее либо оставляли засеянный графт на 1 сут. в чашке Петри с 3 мл среды (статичное засевание клеток, n=5); либо применяли вращение засеянного сосуда вокруг его продольной оси (засевание клеток с помощью центробежной силы); либо помещали сосуд в условия пониженного атмосферного давления (засевание клеток с помощью отрицательного давления).

Для засевания клеток на ДАП с помощью центробежной силы нами был сконструирован специальный ротор для имеющейся центрифуги Jouan C3i multifunction (ThermoScientific, США), позволяющий вращать инсулиновый шприц вокруг его продольной оси. Для этого использована полипропиленовая трубка, наружный диаметр 25 мм, внутренний 16 мм, которая одевалась вместо ротора центрифуги вертикально. Сосудистый кондуит, заполненный клеточной суспензией, помещали внутрь инсулинового шприца (International Medical Products, США). Внутренний диаметр шприца равен 5 мм и совпадает с внешним диаметром графта. Внутрь самодельного ротора (трубки) устанавливали шприц с сосудистым кондуитом, плотно фиксировав его точно в центре (Рисунок 13).

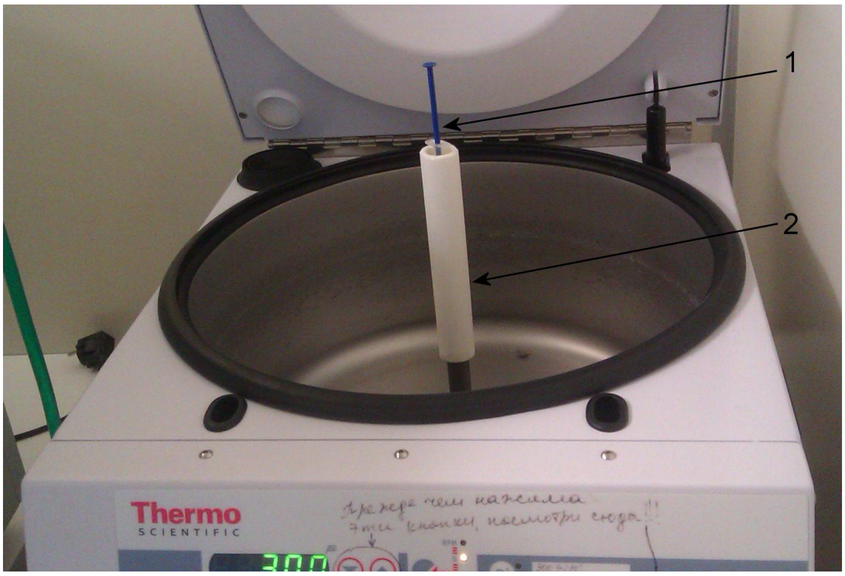


Рисунок 13 - Фотография центрифуги Jouan C3i multifunction с установленным самодельным ротором (2) для вращения засеваемого сосуда вокруг его продольной оси. Сосуд на фотографии не виден, находится внутри одноразового стерильного инсулинового шприца (1)

Испытывали скорость вращения 1000, 3000 и 6000 об./мин. в течение 1, 5 и 10 мин. (общее число графтов = 9). После этого сосудистый кондуит извлекали из шприца, срезали лигатуры, аккуратно промывали 10 мл ФСБ и переносили в чашку Петри с 3 мл культуральной среды на 1 сут. Неадгезивные клетки в промывном растворе осаждали центрифугированием, подсчитывали в гемоцитометре и расчитывали эффективность клеточного засевания по

методике, описанной выше (п.2.7.3).

Для улучшения доставки клеток на носитель с помощью отрицательного давления снаружи сосудистых кондуитов, последние заполняли клеточной суспензией, помещали внутрь стандартной пробирки BD Vacutainer (4 мл, без консервантов, cat.368500, Becton Dickinson, США). Шприцом из пробирки аспирировали 5 мл воздуха. Экспозиция составила 5, 10 и 20 мин. (по 2 образца на каждый временной отрезок, всего 6 графтов). Контроль проводили аналогично, но без вакуумирования (20 мин., n=2). После этого сосудистый кондуит извлекали из пробирки, срезали лигатуры, аккуратно промывали ФСБ и переносили в чашку Петри с 3 мл культуральной среды на 1 сут. Неадгезивные клетки в промывном растворе осаждали центрифугированием и подсчитывали в гемоцитометре и расчитывали эффективность клеточного засевания по методике, описанной выше (п.2.7.3).

Через 1 сут. все засеянные графты отмывали в ФСБ от остатков среды и фиксировали в 4% формалине. Изготавливали поперечные срезы рецеллюляризованных графтов, окрашенные гематоксилином и эозином. С помощью светового микроскопа Leica DM1000 с фотокамерой с увеличением от x10 до x1000 (Leica, Германия) смотрели наличие, количество и распределение клеток в сосудистой стенке.

2.7.5 Подготовка клеток к рецеллюляризации, засевание клеток на децеллюляризованные артерии

Мобилизованные клетки (МСК КМ и МСК ЖТ) осаждали путем центрифугирования в течение 10 мин при 300 rcf. После этого мембраны клеток метили прижизненным флюоресцентным красителем *PKH26* согласно протоколу фирмы-производителя (Sigma, США).

ДАП канюлировали с обеих сторон адаптером типа Люер (BBraun, Германия). $1x10^6$ меченых МСК ресуспендировали в 100 мкл культуральной среды и с помощью пипетки вводили в просвет сосуда. Затем канюли закрывали заглушкой CombiStopper (BBraun, Германия) и инкубировали засеянный сосудистый кондуит в течение 1 ч в CO_2-инкубаторе, вручную поворачивая сосуд каждые 15 мин на 90 ^{o} для более равномерного распределения клеток по его внутренней поверхности. Через час снимали заглушки, и аккуратно промывали засеянные клетками сосуды при помощи ФСБ.

2.7.6 Устройство биореактора

В связи с неудовлетворительными результатами активного внедрения клеток посредством центрифугирования и вакуумирования (см. раздел «Результаты», п. 3.11) было решено использовать комбинацию статичного метода доставки клеток с последующей перфузией сосудистого кондуита в биореакторе.

Оригинальный собственной конструкции биореактор представляет собой замкнутую систему с закрытым контуром, что позволяет проводить постоянную перфузию питательной среды (1) через просвет рецеллюляризируемого сосуда (2) (Рисунок 14). Биореактор состоит из камеры (3) и перистальтического насоса (4), соединенных полихлорвиниловыми трубками (5).

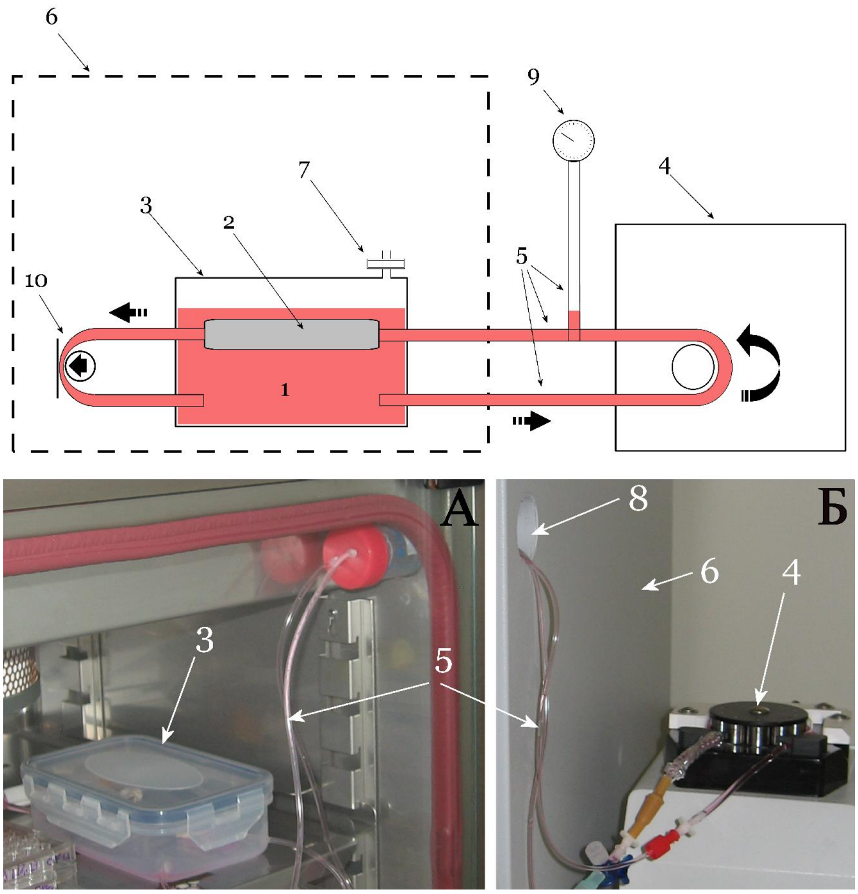


Рисунок 14 - Схема и фотография биореактора, вид внутри (А) и снаружи (Б) CO_2-инкубатора. Обозначения: 1-питательная среда, 2- рецеллюляризируемый сосуд, 3 – камера биореактора, 4-перистальтический насос, 5-соединительные трубки, 6- CO_2-инкубатор, 7- антибактериальный фильтр, 8- технологическое отверстие в боковой стенке инкубатора, 9-манометр, 10 – регулируемое сужение выходной трубки

Камера биореактора была изготовлена из прозрачного пластикового пищевого контейнера 15х10х5 см с герметично закрывающейся крышкой (Lock&Lock, Китай). Она находилась внутри CO_2-инкубатора (6) и служила резервуаром питательной среды. В верхне-боковой части контейнера располагалось вентиляционное отверстие, которое, для снижения риска, контаминации защищали фильтром (7) с размером пор 0,45 мкм (Jet Biofil, Китай). Перистальтический насос Gilson MiniPulse 3 (Gilson, США) размещали рядом с инкубатором. Одноразовые стерильные соединительные трубки (BBraun, Германия) пропускали внутрь инкубатора через технологическое отверстие в его боковой стенке (8). Все соединения осуществлялись через Люер-коннекторы. Снаружи инкубатора, на выходную трубку насоса

устанавливали аналоговый манометр (Microlife, Швейцария) (9) для измерения давления жидкости в системе. Необходимое давление создавали путем увеличения периферического сопротивления на выходе из камеры биореактора, осуществляя внешнюю компрессию трубки (10).

2.7.7 Культивирование тканеинженерных сосудов в статичных условиях и с применением оригинального проточного биореактора

Часть сосудов (группа I, n=18, из них 9 засеяны МСК КМ, другие 9 – МСК ЖТ) культивировали в статичных условиях. Для этого, засеянные сосудистые кондуиты помещали в 6-луночные планшеты (Corning-Costar, США), добавляли в лунки по 3 мл культуральной среды, после чего инкубировали образцы в CO_2-инкубаторе в течение 5, 10 и 21 суток. Смену среды проводили каждые третьи сутки.

Другую часть сосудов (группа II, n=6, из них 3 засеяны МСК КМ, другие 3 – МСК ЖТ) культивировали в биореакторе. Засеянные сосуды через Люер-адаптеры фиксировали к соответствующим разъемам в камере биореактора (Рисунок 15).

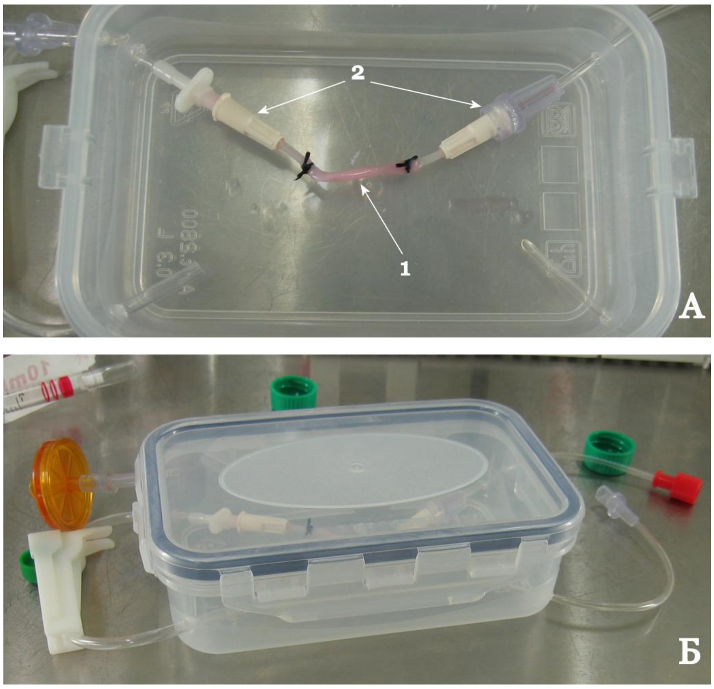


Рисунок 15 - А - Фотография сосудистого кондуита (1), засеянного МСК, расположенного в камере биореактора; (2) - адаптеры. Б –Фотография камеры биореактора, подготовленной к работе

После этого заполняли камеру 30 мл культуральной среды и начинали перфузию через просвет сосуда со скоростью 1 мл/мин. Через 1 час скорость перфузии увеличивали до 2 мл/мин. На следующий день повышали давление внутри системы до 20-40 мм рт. ст., скорость перфузии увеличивали до 5 мл/мин. Перфузию продолжали в течение 5 сут. Среду в

биореакторе не меняли.

По окончании рецеллюляризации сосудистые кондуиты обеих групп отмывали ФСБ. Для исследования количества и жизнеспособности клеток в стенке рецеллюляризованных сосудов от каждого графта (рецеллюляризированного сосуда) отсекали участок длиной 1 см (см. п.2.7.8). Большую часть каждого графта (около 2-3 см) фиксировали в формалине, дегидратировали в спиртах и заливали в парафиновые блоки по стандартной программе на автоматическом тканевом процессоре Leica TP 1020 (Leica, Германия). Изготавливали поперечные срезы рецеллюляризованных сосудов, которые окрашивали гематоксилином и эозином (Dako, Дания) для общей оценки препарата и визуализации клеток. Изучение микропрепаратов проводили на световом микроскопе с фотокамерой с увеличением от х40 до х400 (Leica, Германия).

2.7.8 Оценка концентрации клеток на матриксе, оценка их жизнеспособности

Изготовлено и изучено 24 препарата. Визуализацию живых клеток проводили с помощью флюоресцентного красителя *CFSE* (Invitrogen, США). Для этого применяли рекомендованную производителем методику окрашивания адгезивных клеток, с собственными модификациями. А именно, участок исследуемого сосуда длиной 1 см разрезали вдоль так, что получался прямоугольный участок ткани, который помещали в раствор красителя *CSFE* (10мкМ) и инкубировали 15 мин при 37 ^{o}C. Затем трижды отмывали образец раствором ФСБ и инкубировали его 30 мин в полной питательной среде при 37 ^{o}C. После этого снова трижды отмывали образец в ФСБ, распластывали его на предметном стекле и анализировали с помощью микроскопа Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss, Германия) с флуоресцентной лампой и фотокамерой Powershot (Canon, Япония). Количество клеток, меченых *PKH26* и видимых в красном диапазоне спектра соответствовало общему количеству клеток на матриксе. Визуализировавшиеся в желто-зеленом свете клетки, чья цитоплазма окрасилась красителем *CFSE*, считались живыми. Клетки подсчитывали в 4 полях зрения при увеличении х200 (всего 96 полей зрения).

2.8 Изучение тканеинженерных сосудов в экспериментах *in vivo*

2.8.1 Лабораторные животные, использованные в работе

Эксперименты проведены на самцах крыс породы Вистар массой 200–300 г (питомник «Рапполово» РАМН, г. Санкт-Петербург). Животных содержали в отдельных клетках, со стандартным суточным режимом и свободным доступом к воде и корму. Содержание и работу с лабораторными животными проводили в соответствии с требованиями приказа Министерства здравоохранения Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики». Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом

ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» (ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова»).

2.8.2 Характеристика имплантатов

В качестве протеза брюшного отдела аорты крысам имплантировали либо свежевыделенную аорту другой крысы (группа 1, контроль, n=5), либо ДАП (группа 2, n=10), либо ТИКС (группа 3, n=10). Всего поставлено 25 опытов.

Для получения контрольного сосуда, используемого в группе 1, проводили эвтаназию животного-донора внутрибрюшинным введением хлоралгидрата (1,2 г/кг). Иссекали участок брюшного отдела аорты, который помещали в охлажденную питательную среду (4 ^{o}C). Срок до имплантации животному-реципиенту составил менее 1 ч.

ДАП, использованные в группе 2, предварительно помещали в полную культуральную среду на 1 сут. (4 ^{o}C).

ТИКС, которые имплантировали крысам группы 3, засевали статичным способом МСК ЖТ и культивировали в проточном биореакторе в течение 5 сут., как описано выше (п.2.7.7). Мы выбрали МСК ЖТ в связи с их более быстрым ростом в культуральных плашках, что позволяло нарабатывать большее количество клеток за меньшее время. В то же время, при проведении рецеллюляризации сосудистых кондуитов на предыдущем этапе мы не обнаружили разницы при использовании МСК КМ и МСК ЖТ (см. главу «Результаты», п. 3.11).

Через 40-50 мин. извлеченные из биореактора графты помещали в охлажденную питательную среду (4 ^{o}C) и доставляли в операционную.

В связи с очевидной разницей диаметра нормальной аорты крысы (1-1,2 мм) и артерий пуповины (их диаметр при физиологическом давлении около 4 мм), последние перед имплантацией в брюшную аорту «ушивали» до необходимого размера. Для этого, непосредственно перед операцией в асептических условиях с использованием операционного стереоскопического микроскопа МБС-10 (ОАО «ЛЗОС», Россия) и микрохирургической техники, ДАП, равно как и ТИКС, рассекали продольно и сшивали на периферическом катетере (для в/в инфузий «Vasofix», размер 20G, внешний диаметр 1.1 мм, BBraun, Германия) отдельными узловыми швами полиамидной нитью 10/0 (W2970, Ethilon, Ethicon, США) (Рисунок 16 и Рисунок 17). Затем вынимали иглу и переносили подготовленный сосуд в охлажденную питательную среду (4 ^{o}C).

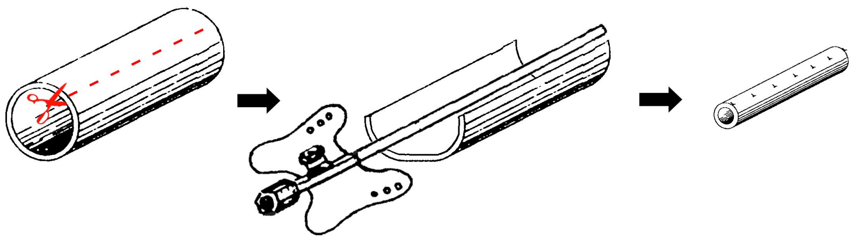


Рисунок 16 - Схема уменьшения диаметра де- и рецеллюляризованных артерий

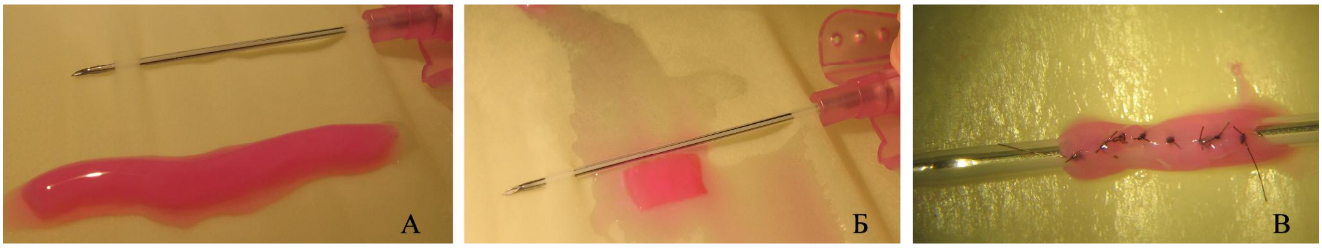


Рисунок 17 - Процедура уменьшения диаметра артерий пуповины. Фотографии во время выполнения операций. А – графт расположен рядом с иглой, внешний диаметр которой 1.1мм; Б – сосуд рассечен продольно. В – графт ушит до диаметра иглы

2.8.3 Имплантатация исследуемых сосудов

Крыс наркотизировали однократным внутрибрюшинным введением хлоралгидрата (Sigma, США) из расчёта 425 мг/кг массы тела животного. Операцию проводили с использованием операционного стереоскопического микроскопа МБС-10 (ОАО «ЛЗОС», Россия). Крысу укладывали на подогреваемый коврик (37 ^{o}C, ATC1000, World Precision Instruments, США) в положении на спине. Операционное поле брили и двукратно обрабатывали антисептиком (Erisan PreDes, Farmos Oy, Финляндия). Выполняли срединную лапаротомию, в брюшную полость однократно вводили 50 МЕ гепарина натрия (BBraun, Германия) и цефуроксим (30 мг/кг, Аксетин, Medochemie, Кипр) с целью профилактики инфекционных осложнений. Выделяли брюшной отдел аорты от почечных артерий до бифуркации. Боковые ветви перевязывали и пересекали. С помощью микроклипс пережимали аорту сразу под почечными артериями и над бифуркацией. Иссекали участок аорты между микроклипсами. В образовавшийся дефект длиной 8-10 мм вшивали подготовленный кондуит: нативная аорта крысы-реципиента (группа 1, контроль), ДАП (группа 2) или ТИКС (группа 3). Узловыми швами формировали два анастомоза по типу конец-в-конец полиамидной нитью 10-0 (W2970, Ethilon, Ethicon, США) с использованием микрохирургической техники (увеличение x8-x16). Кровоток восстанавливали, снимая сначала дистальную микроклипсу, затем проксимальную. После запуска кровотока проводили гемостаз и визуально контролировали проходимость шунта. Рану послойно ушивали рассасывающейся нитью с антибактериальным покрытием (Vicryl Plus, 4-0, VCP496H, Ethicon, США). В послеоперацинном периоде за животным наблюдали до пробуждения, после чего содержали в стандартных условиях. Антикоагулянты и дезагреганты не назначали.

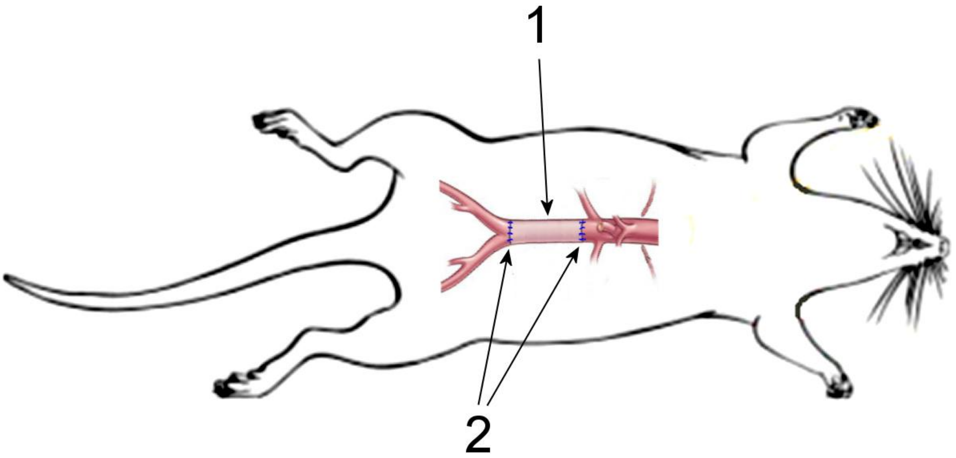


Рисунок 18 - Схема операции: протезирование инфраренального отдела аорты крысы. 1 - протез сосуда; 2 – места наложения анастомозов.

2.8.4 Выведение животных из эксперимента

Крыс выводили из эксперимента на 30-е сут. после операции. При наличии проявлений тромбоза шунта (задний парапарез) крыс умерщвляли раньше планируемого срока наблюдения. Одно животное из группы 3 без признаков тромбоза аорты выведено из эксперимента на 2-е сут. после операции для оценки динамики клеточного состава сосудистой стенки в раннем послеоперационном периоде. Это животное не учитывали при расчёте степени проходимости изучаемых сосудов.

Перед умерщвлением крыс наркотизировали внутрибрюшинным введением хлоралгидрата как описано выше. Выполняли срединную лапоротомию и оценивали состояние тканей вокруг протеза, сращения, вид зоны протезирования, наличие расширения и т.п. Далее выделяли участок протезированного брюшного отдела аорты и визуально оценивали его проходимость. В каждой группе рассчитывали количество проходимых сосудов к общему числу имплантированных в этой серии. Для определения проходимости графта использовали так называемый «сдаивающий» тест (Acland R.D., 1972) (Рисунок 19).

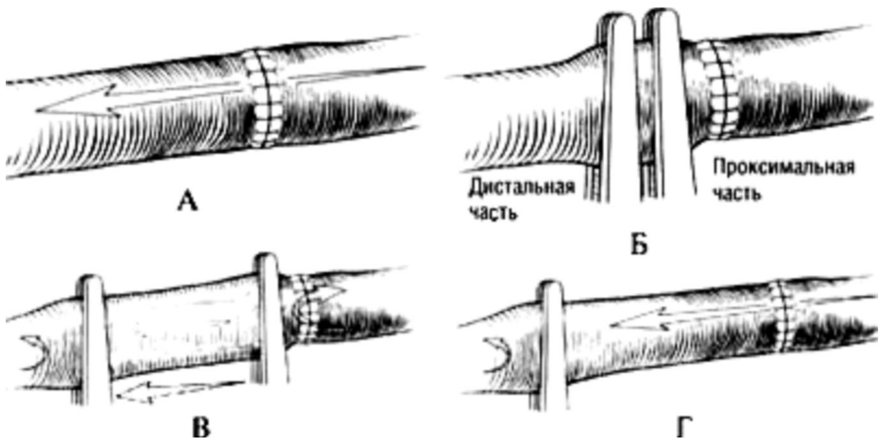


Рисунок 19 - Схема выполнения теста Acland для подтверждения антеградного сосудистого кровотока через анастомоз: А – направление кровотока обозначено стрелкой; Б – дистальнее

сосудистого анастомоза наложено 2 микропинцета; В – кровь удаляют в дистальном направлении путем аккуратного скольжения дистального микропинцета, в результате образуется участок сосуда, спавшийся между этими микропинцетами; Г – если анастомоз проходим, при снятии проксимального микропинцета коллабированный участок сосуда мгновенно заполняется током крови. Дистальный микропинцет предотвращает ретроградное наполнение коллабированного участка.

Затем животных умерщвляли введением в заднюю полую вену летальной дозы хлоралгидрата (1,2 г/кг). Имплантаты 2 и 3 групп иссекали вместе с участком аорты проксимальнее зоны протезирования и с частью повдздошных артерий дистальнее графта. Полученные образцы фиксировали в 4% формалине, заключали в парафин и в дальнейшем изготавливали поперечные срезы толщиной 10 мкм. Последние окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван-Гизону с эластикой, выполняли ИГХ анализ с антителами к антигенам CD-31 и α-SMA аналогично описанной в разделе 2.2 методике для ДАП. Гистологические исследования были направлены на оценку морфологических изменений, произошедших в стенке графтов *in vivo*. ИГХ анализ проводили для выявления клеток с соответствующими антигенами, характерными для эндотелиоцитов и миоцитов. Кроме этого изготавливали неокрашенные срезы, которые анализировали с помощью флюоресцентного микроскопа Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss, Германия) в красном спектре для оценки наличия и распределения клеток, меченых до имплантации прижизненным флюоресцентным красителем *PKH26* (Sigma, США).

Сосуды группы 1 (нативная аорта крысы, контроль) морфологически не исследовали.

2.9 Статистический анализ

Данные, полученные при проведении исследований, были обработаны в программе Microsoft Excel 2010. Результаты приводятся как среднее арифметическое значение ± стандартное отклонение. Степень достоверности межгрупповых различий средних значений оценивали с помощью парного t-теста Стьюдента с двухсторонним распределением (функция «СТЬЮДЕНТ ТЕСТ» в Microsoft Excel 2010). Нулевая гипотеза заключалась в равенстве исследуемых групп. Если результат t-теста был больше уровня значимости (a=0,05), отличия в выборках считали достоверно не отличающимися друг от друга (P<0,05) (Макарова Н.В., 2002; Гмурман В.Е., 2003).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Выделение артерий из пуповины, макроскопическая характеристика нативных артерий

Из каждой пуповины выделяли обе артерии, их длина соответствовала таковой пуповины и колебалась от 15 до 52 см (Рисунок 20). АП представляли собой мышечного типа артерии диаметром 2-3 мм в состоянии спазма. При заполнении жидкостью, наружный диаметр сосуда увеличивался до 4 мм. Спиралевидный ход артерий связан с характерным закрученным их положением в пупочном канатике.

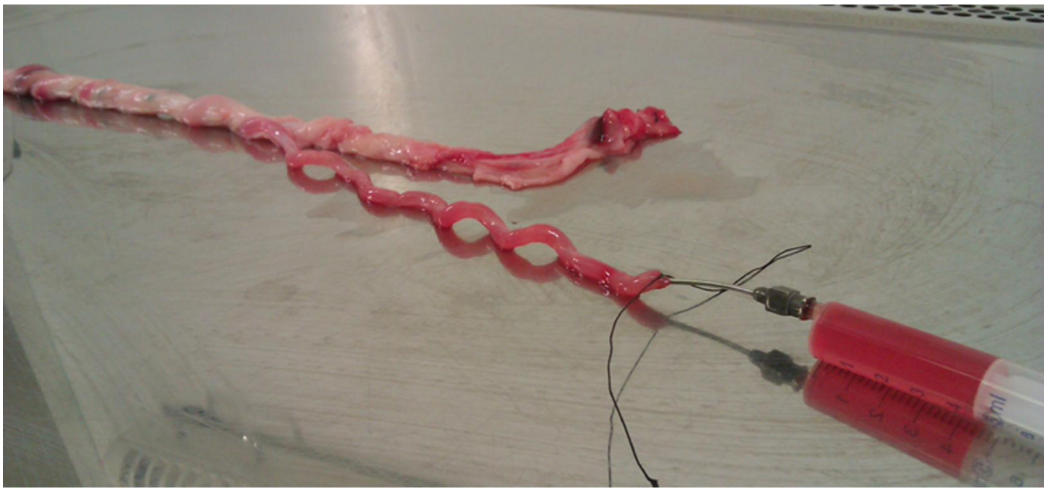


Рисунок 20 - Выделение одной из артерий пуповины.

3.2 Результат апробации различных способов децеллюляризации

Всего было изготовлено и изучено 18 фрагментов АП (по 3 участка АП каждым способом, всего 48 гистологических препаратов). Ни один из 6 вариантов децеллюляризации, апробированных на АП, не привел к полной элиминации клеточного дебриса из стенки сосуда (Таблица 2).

Таблица 2 - Результаты апробации различных способов децеллюляризации

Способ децеллюляризации	Окраска гематоксилином и эозином	Окраска по Ван-Гизону с эластикой	ИГХ: CD31	ИГХ: α-SMA
Способ 1	практически полностью отсутствовал эндотелий, но сохранялось большинство клеток в медии	«Рыхлая» структура ВКМ	н/п	н/п
Способ 2	клетки не визуализировались	сохранный ВКМ	ИГХ-	ИГХ+
Способ 3	Эндотелий отсутствует, небольшое количество ядер	выраженное нарушение структуры	н/п	н/п

	клеток без четких контуров в медии	ВКМ		
Способ 4	клетки не визуализировались	сохранный ВКМ	ИГХ-	ИГХ+
Способ 5	практически полностью отсутствовал эндотелий, но сохранялось небольшое количество клеток в медии	ВКМ стал более компактным	н/п	н/п
Способ 6	Клеток значительно меньше, чем в нативной артерии, их ядра стали заметно бледнее	сохранный ВКМ	н/п	н/п

Примечание - «н/п» – исследование не проводилось; «ИГХ+» - положительная окраска на антиген; «ИГХ-» - отрицательная окраска на антиген.

Как уже сказано (п.2.1.3) неудовлетворенность результатами апробированных способов децеллюляризации привела к разработке собственной методики. При этом описанная технология является следствием многократных экспериментов (не менее 16) со сменой параметров децеллюляризации, таких как: длительность, температура, концентрация и очередность использованных децеллюляризационных агентов. Самым сложным оказалось соблюсти баланс между максимально полным удалением клеток и их остатков с минимальным повреждением ВКМ. Это было достигнуто следующим образом: после подбора оптимальной последовательности реагентов уменьшали их изначально высокую концентрацию и время их воздействия до минимально необходимого уровня, при котором децеллюляризация оставалась эффективной.

Далее результаты приводятся только для АП, децеллюляризованных по оригинальной методике. Эффективность разработанного способа децеллюляризации проверена в серии последовательных экспериментов, при этом достигнуты воспроизводимые результаты. Всего в ходе разработки собственного способа децеллюляризации АП исследованоо более 200 образцов фрагментов этого сосуда.

3.3 Макроскопическая характеристика, результаты гистологического и иммуногистохимическкго исследования децеллюляризованных артерий пуповины человека

ДАП сохраняли свою исходную форму и размеры, теряя естественный цвет и становясь белесыми, что характерно для всех децеллюляризованных тканей (Gilbert T.W. et al., 2006; Crapo P.M. et al., 2011) (Рисунок 21). Если исходно АП спазмированы, то после проведения

децеллюляризации они становятся дилатированными, возможно из-за отсутствия ГМК.

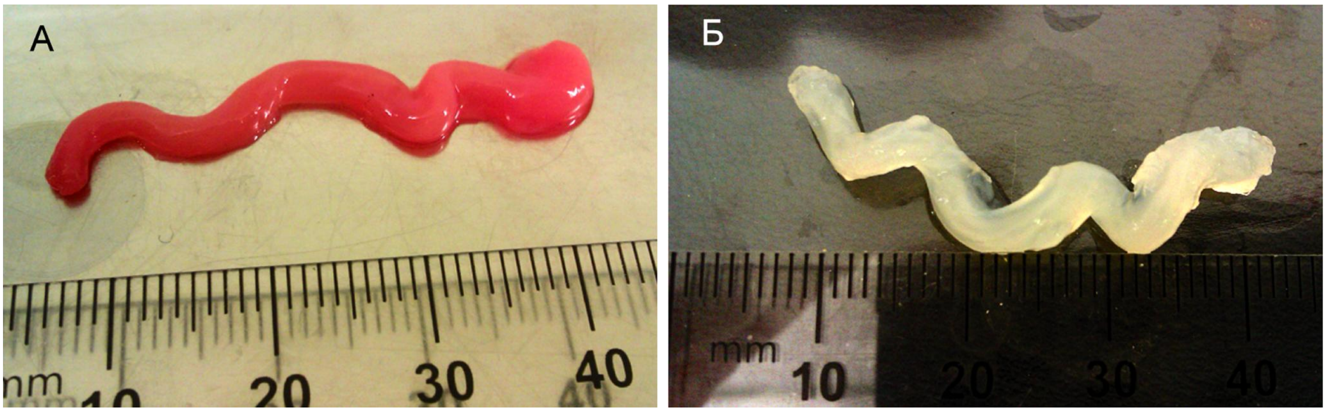


Рисунок 21 - Фрагмент нативной (А) и децеллюляризованной (Б) артерии пуповины человека

Для гистологического и ИГХ исследования использовали 2 фрагмента необработанной артерии и 20 фрагментов ДАП, каждый длиной 5 см. При световой микроскопии нативная АП имела характерное для артерий мышечного типа строение, но у сосуда отсутствует адвентиция – её роль выполняет Вартонов студень (Рисунок 22-А).

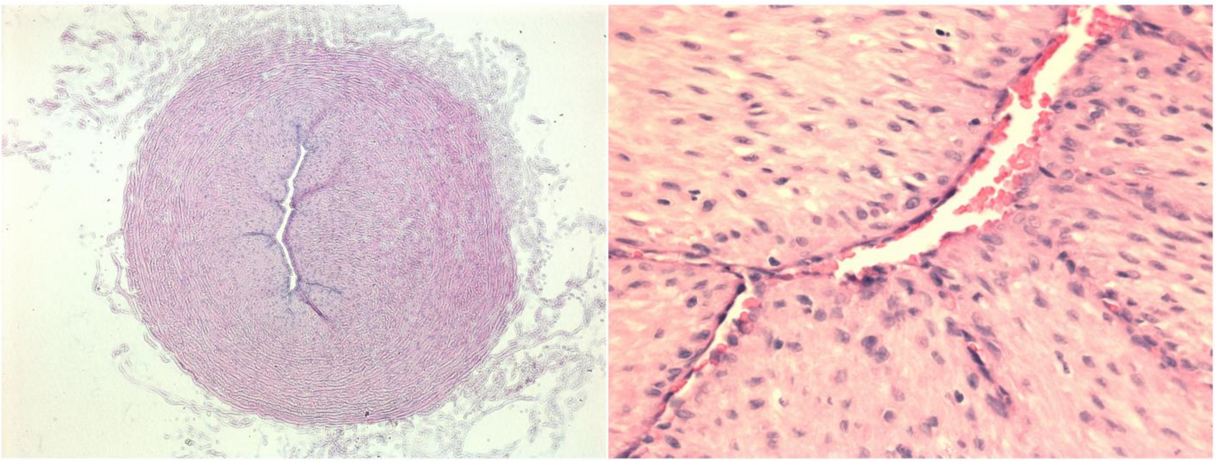


Рисунок 22 - Микрофотографии поперечных срезов отпрепарированной артерии пуповины человека, окраска гематоксилином и эозином, увеличение x50(А), x400(Б)

Просвет артерий сужен, по-видимому, из-за спазма ГМК, имеет неправильную звездчатую форму (Рисунок 22-Б). Внутренняя поверхность сосуда покрыта эндотелием. Средняя оболочка достаточно толстая, состоит из слоя продольных ГМК и наружного слоя радиально-расположенных ГМК. После децеллюляризации сосуда клетки отсутствуют, просвет артерии дилатирован, а толщина её стенки несколько уменьшается (Рисунок 23-Б,Г,Е,З). Для наглядности на левых панелях рисунка приведены микрофотографии фрагмента необработанной АП (Рисунок 23-А,В,Д,Ж).

Окрашенные гематоксилином и эозином гистологические препараты (Рисунок 23-А,Б) дают наглядную картину состояния сосуда: стенка нативной артерии богата хорошо

окрашенными ядрами клеток (Рисунок 23-А), стенка ДАП имеет характерную пористую структуру, ядра клеток не видны (Рисунок 23-Б). Не было разницы в характере морфологических изменений стенки артерии на поперечных срезах не зависимо от того, какой срез сосуда исследовали (по краям или в центре, в соответствии с Рисунок 10). Это говорит о том, что разработанная методика позволила проводить равномерную децеллюляризацию АП на всём обрабатываемом участке.

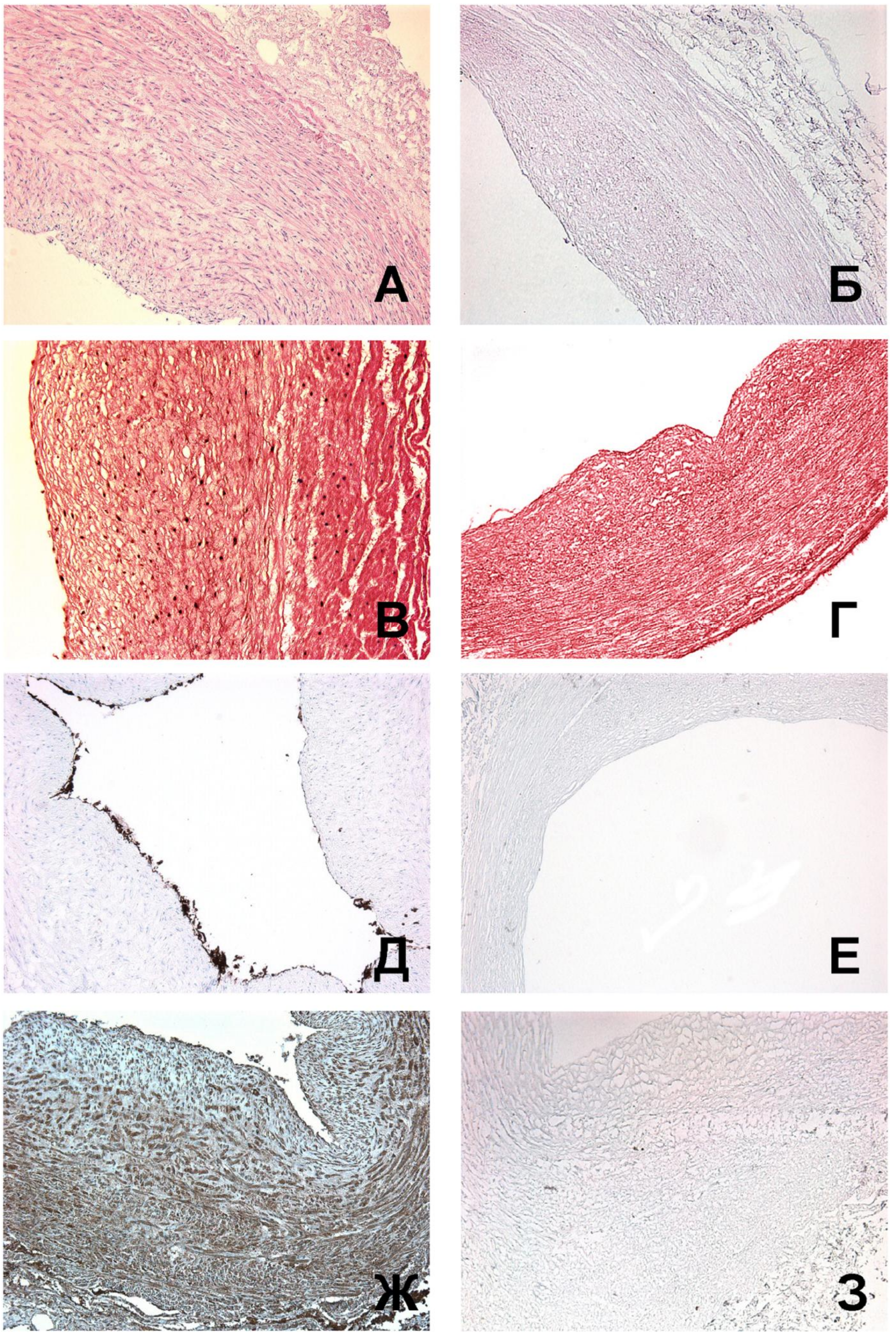


Рисунок 23 - Микрофотографии поперечных срезов нативной (А,В,Д,Ж) и децеллюляризованной (Б,Г,Е,З) артерии пуповины человека. А,Б – окраска гематоксилином и эозином, увеличение х200. В,Г – окраска по Ван-Гизону, увеличение х200. Д, Е – ИГХ-исследование на антиген CD31, увеличение х100. Ж,З – ИГХ-исследование на антиген α-SMA, увеличение х200.

При окраске по Ван-Гизону (Рисунок 23-В,Г), тропной к соединительно-тканным волокнам, видно, что ВКМ, состоящий преимущественно из коллагена остается неизмененным.

Антиген CD31 (PECAM-1), находящийся на мембранах эндотелиальных клеток, использовали при ИГХ анализе как маркер остатков этих клеток. На внутренней поверхности нативной артерии видно специфическое окрашивание эндотелиального слоя (Рисунок 23-Д) в коричневый цвет. После обработки артерий по разработанному нами протоколу этот антиген визуально не определяется, что говорит о полной элиминации эндотелиоцитов и их остатков (Рисунок 23-Е).

В качестве маркера ГМК использовали α-SMA. АП, являясь типичной артерией мышечного типа, богата ГМК (Рисунок 23-Ж). После децеллюляризации (Рисунок 23-З) α-SMA визуально не обнаруживается, что косвенно подтверждает не только лизис ГМК, но и удаление клеточного дебриса из всей толщи сосудистой стенки.

3.4 Результаты исследования содержания нуклеиновых кислот в децеллюляризованных артериях

Для визуального определения нуклеиновых кислот в образцах тканей использовали окраску DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид), высокотропную к ДНК и РНК.

В нативных АП (контроль, n=3), окрашенных DAPI, определялась характерная флюоресценция ядер. При этом в фрагментах ДАП (n=5) нуклеиновые кислоты не визуализировались (Рисунок 24). Это подтверждает удаление из стенки артерии в процессе децеллюляризации ДНК и РНК, которые могут вызвать иммунный ответ реципиента.

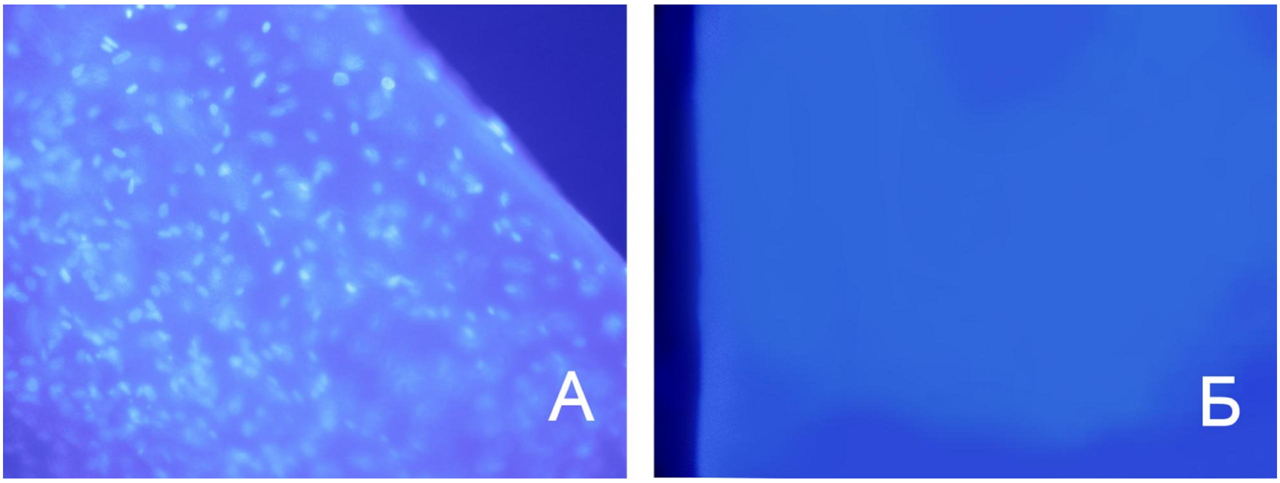
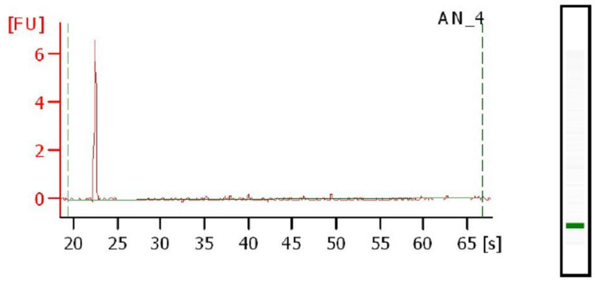
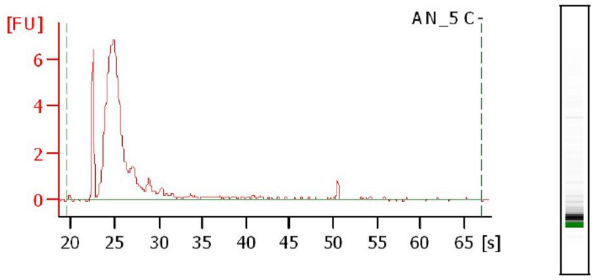


Рисунок 24 - Фрагменты артерий пуповины до (А) и после децеллюляризации (Б). Окраска DAPI, увеличение x100. Отчетливо видны ядра клеток в нативной артерии, в то время как в ДАП нуклеиновые кислоты не визуализируются

Спектрофотометрическое исследование содержания нуклеиновых кислот в образцах АП показало, что в нативном сосуде уровень ДНК составляет 81,9 нг/мкл элюата, а в фрагментах

ДАП ДНК отсутствует. В необработанной артерии уровень РНК был ожидаемо высоким и составил 98,4 нг/мкл элюата. После децеллюляризации РНК отсутствовала, либо определялись следовые её концентрации. При качественном анализе РНК нативной АП показатель уровня её сохранности (RNA Integrity number, RIN) составил 2,3, в то время как в образцах ДАП RIN не определялся (т.е. равнялся нулю) (Рисунок 25).





Образец:	**Нативная АП (контроль)**	**ДАП**
Область РНК	64.8	0.8
Концентрация РНК	59 нг/мкл	1 нг/мкл
коэф. рРНК [28s / 18s]	0.0	0.0
Уровень сохранности РНК (RIN)	2.3	не определяется

Рисунок 25 - Электрофереграммы РНК нативной (слева) и децеллюляризованной (справа) артерий пуповины человека. По оси абсцисс – время детекции (сек.), по оси ординат – единицы флюоресценции РНК. В децеллюляризованной артерии определяются следовые количества полностью деградированной РНК

3.5 Результаты исследования механической прочности испытуемых сосудов

В экспериментах этого раздела исследовали механическую прочность АП путем заполнения их жидкостью до разрыва. Всего проведено 4 серии опытов, в которых использовано по 10 фрагментов артерий: соответственно нативных, ДАП, ДАП после 10-месячного хранения в ФСБ и криоконсервированных ДАП. Всего при изучении механической прочности испытуемых сосудов (разделы 3.5-3.8) выполнено 109 экспериментов.

Разрушение нативных АП (I группа, контроль) происходило при давлении внутри сосуда равном 951±161 мм рт. ст.

Максимальное давление, которое выдерживали ДАП II и III групп, было несколько ниже, но достоверно не отличалось от показателя нативных АП, и составило 933±124 мм рт.ст. во II группе и 915±131 мм рт.ст. в III группе. Механическая прочность криоконсервированных ДАП (IV группа) была значительно ниже, они разрушались при давлении 456±123 мм рт.ст. (Рисунок 26).

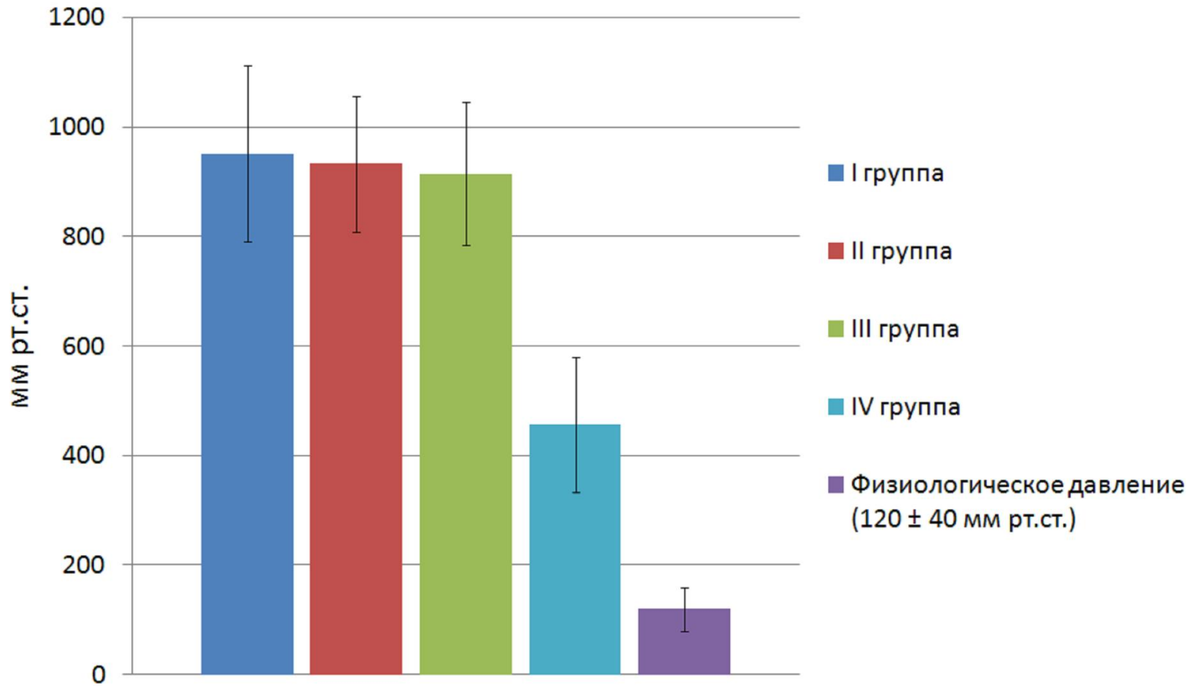


Рисунок 26 - Пиковое давление в испытуемых сосудах в сравнении с физиологическим артериальным давлением человека (пояснения в тексте)

Разрушение артерий проявлялось в виде продольных разрывов стенки. Нативные артерии и ДАП сохраняли естественную трубчатую форму без выпячиваний стенки вплоть до момента разрыва.

Несмотря на то, что пиковое давление, при котором происходил разрыв образцов ДАП IV группы было выше физиологического артериального давления, мы отказались от использования и изучения криоконсервированных ДАП.

3.6 Результаты исследования упруго-эластических свойств испытуемых сосудов

В этой серии опытов, как уже сказано (п.2.5.3), проводили медленное растяжение образцов нативной АП, ДАП, ДАП после 10-месячного хранения в ФСБ. Исследовано по 10 образцов артерий пуповины в каждой группе, всего проведено 30 опытов. При растяжении в продольном направлении получены воспроизводимые результаты. Средняя исходная длина (L_0) в I группе равнялась 28,9±2,9 мм, во II группе – 30,7±4 мм и в III группе – 28,7±3,1 мм. Усредненные кривые зависимости деформации от нагрузки, прилагаемой к испытуемым сосудам, приведены на Рисунок 27. Максимум нагрузки, при котором происходило разрушение испытуемых образцов, для нативных АП составил 0,96±0,15 Н, для артерий II и III групп – 0,92±0,11 Н и 0,85±0,13 Н, соответственно. Межгрупповые различия статистически не значимы. При этом отмечено, что ДАП оказались более растяжимыми, чем нативные АП. Средний максимум деформации в момент разрушения составлял 33% для сосудов I группы, 47% и 49% для сосудов II и III групп, соответственно.

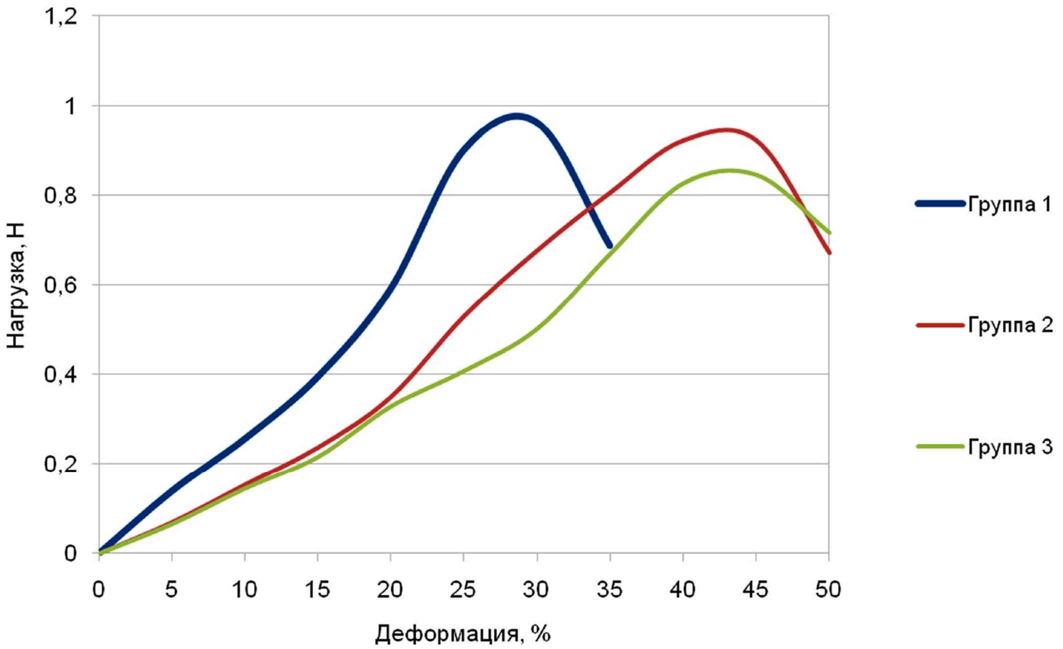


Рисунок 27 - Зависимость растяжения испытуемого образца от прикладываемой к нему нагрузки в продольном направлении. По оси абсцисс – увеличение длины образца от исходной (%), по оси ординат – нагрузка (ед. измерения - Ньютон)

При растяжении артерий в поперечной плоскости (также по 10 образцов в каждой группе) начальное расстояние между П-образными крючками (L_0) составило 2,94±0,2 мм, 2,96±0,2 мм и 2,97±0,2 мм, максимум нагрузки – 2,5±1,2 Н, 3,0±1.4 Н и 3,0±1,1 Н, а среднее изменение длины (ΔL) до разрушения образцов – 252±58%, 318±31% и 270±32% для I, II и III групп, соответственно. Межгрупповые различия были не значимы. На Рисунок 28 представлены усредненные кривые зависимости деформации от нагрузки, прилагаемой к испытуемым сосудам.

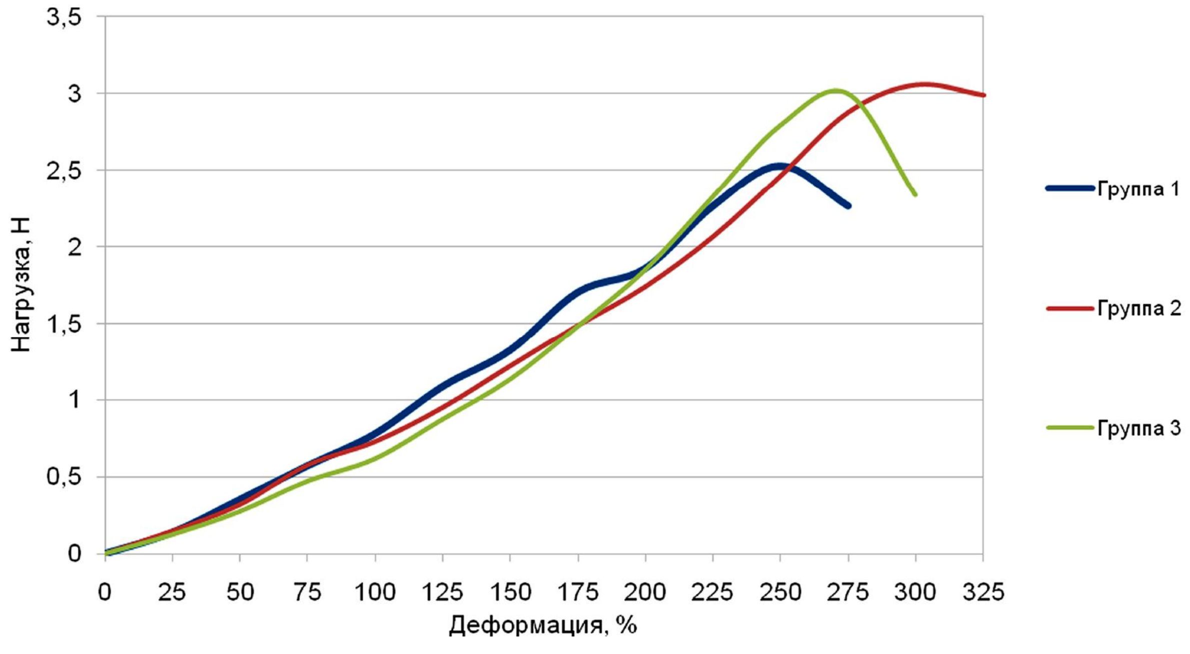


Рисунок 28 - Зависимость растяжения испытуемого образца от прикладываемой к нему

нагрузки в поперечном направлении. По оси абсцисс – увеличение длины образца от исходной (%), по оси ординат – нагрузка (ед. измерения - Ньютон)

3.7 Результаты определения устойчивости к прорезыванию шовным материалом испытуемых сосудов

В экспериментах этого раздела прошивали край исследуемой артерии нитью, которую затем вытягивали сквозь стенку сосуда. Нагрузка, которую необходимо было приложить, характеризовала устойчивость АП к прорезыванию шовным материалом.

Сравнивали данные, полученные при тестировании 10 артерий каждой из трех групп. Во всех случаях происходило разрушение образца в месте шва (то есть прорезывание ткани артерии нитью). У нативных АП нагрузка при этом составила 0,54±0,14 Н, у ДАП 0,53±0,12 Н, ДАП после хранения 0,53±0,15 Н. Межгрупповые различия статистически не значимы.

3.8 Результаты определения размеров сосудистой стенки

С помощью компьютерной программы для анализа изображений определяли площадь поперечного сечения (S) и толщину сосудистой стенки трех препаратов из каждой группы.

Площадь поперечного сечения сосудов I группы была равна 3,3±0,37 мм^2. Удаление клеток из сосудистой стенки привело к уменьшению этого показателя до 2,35±0,15 мм^2 (II группа) и 2,3±0,22 мм^2 (III группа), что составило 71,3% и 69,6% от исходного показателя, соответственно. Таким образом, после 10 мес. хранения площадь поперечного сечения ДАП значимо не изменилась (p=0,81). При этом отмечено уменьшение толщины стенки сосуда в II и III группах относительно I (650 мкм исходно, 424 мкм и 429 мкм во II и III группах, соответственно) с сохранением величины наружного диаметра (2,26 мм в I группе, 2,2 и 2,15 мм во II и III группах, соответственно) (Рисунок 29).

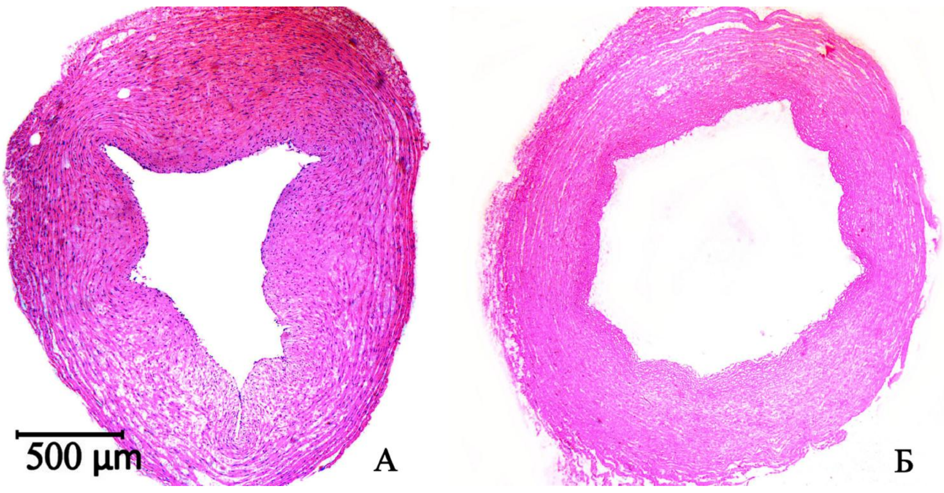


Рисунок 29 - Микрофотографии поперечных срезов нативной (А) и децеллюляризованной (Б) артерии пуповины человека, окраска гематоксилином и эозином, увеличение х40.

3.9 Тест на стерильность децеллюляризованных сосудистых кондуитов

Через 7 сут. в термостате при +37^{o}C во всех пробирках с ДАП (n=4) и отрицательном контроле (стерильный ФСБ, n=2) среда осталась неизмененной, прозрачной. В то же время в пробирках с нативными АП (положительный контроль, n=4) появились признаки контаминации, на что указывало помутнение среды, образование хлопьев и пленки на её поверхности, наличие характерного запаха (Рисунок 30).

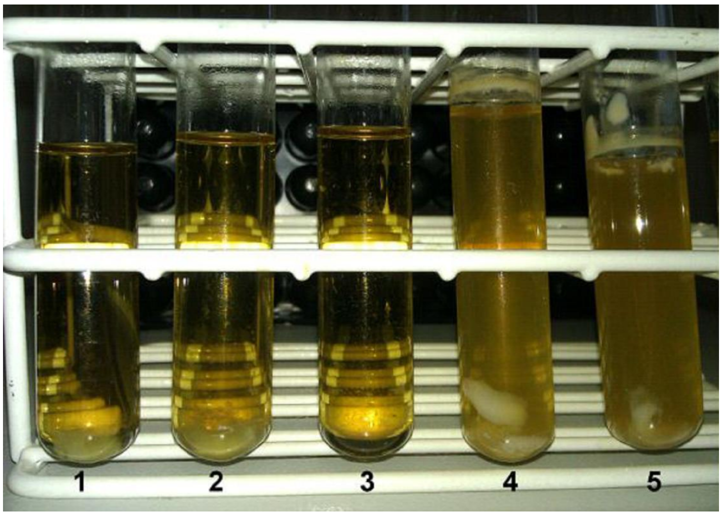


Рисунок 30 - Тест на стерильность. Вид пробирок через 7 сут.

Пробирки №1 и №2 – фрагменты децеллюляризованных артерий. Пробирка № 3 – ФСБ (отрицательный контроль). Пробирки №4 и №5 - фрагменты нативных артерий (положительный контроль)

Отсутствие стерильности нативных АП объясняется контаминацией пуповины при естественном родоразрешении. Однако, по всей видимости в процессе децеллюляризации АП удаляются не только клетки сосудистой стенки, но и бактериальные клетки, которые могли бы стать причиной инфицирования будущего ТИКС.

3.10 Результаты испытаний различных способов доставки клеток на носитель

3.10.1 Выявление оптимального количества клеток в клеточной суспензии

В экспериментах этого раздела определяли оптимальную концентрацию клеточной суспензии для рецеллюляризации ДАП. Объем вводимой в просвет сосуда суспензии был постоянен и равнялся 100 мкл. Количество МСК КМ различалось от $1x10^5$ до $3x10^6$. Для каждой исследуемой концентрации опыт был повторен 3 раза, всего проведено 15 экспериментов.

Поправочный коэффициент k, снижающий погрешность расчёта, связанную с потерей некоторого числа клеток при центрифугировании составил 1,17. Результаты исследования приведены в таблице 3 (среднее арифметическое значение ± стандартное отклонение) и на Рисунок 31.

Таблица 3 - Результаты определения эффективности засевания ДАП различным количеством МСК

N исх. (кл.)	N ост. (кл.)	N адг. (кл.)	Эффективность, %
1x10^5	3,5±0,5 x10^4	5,9±0,6 x10^4	59±5,9
5x10^5	1,9±0,3 x10^5	2,7±0,3 x10^5	55,5±6,2
1x10^6	5,2±0,3 x10^5	4,0±0,3 x10^5	39,5±3,6
2x10^6	1,3±1,0 x10^6	4,1±1,2 x10^6	20,4±5,8
3x10^6	2,2±1,3 x10^6	4,1±1,5 x10^6	13,7±4,9

Примечание - Nисх. – количество засеваемых клеток, Nост. – количество не фиксировавшихся на графте клеток, Nадг. – расчётное количество сохранившихся на графте клеток с учетом поправочного коэффициента.

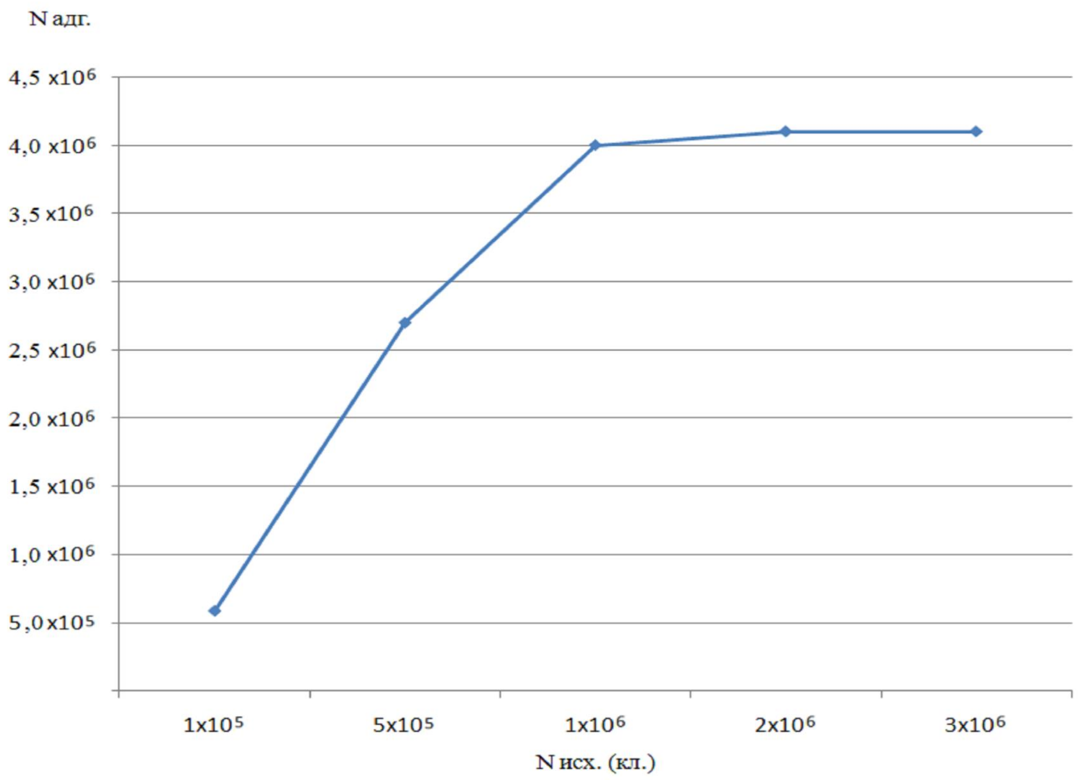


Рисунок 31 - График зависимости количества сохранившихся на графте клеток от их исходного количества. По оси абсцисс - количество засеваемых клеток, по оси ординат - расчётное количество сохранившихся на графте клеток с учетом поправочного коэффициента.

Как видно из представленных данных, с повышением концентрации клеточной суспензии происходило линейное повышение количества адгезировавших на матрице клеток, но только до определенного уровня. При повышении исходного количества клеток более 1x10^6, значимого увеличения адгезировавших клеток не происходило. Таким образом, оптимальным содержанием МСК в исходной клеточной суспензии является 1x10^6 клеток, что составляет 2x10^5 клеток/см

длины засеваемого сосуда. Эффективность засевания при этом составила 39,5%.

3.10.2 Результаты статичного засевания децеллюляризованных артерий

В экспериментах этого раздела проводили рецеллюляризацию графтов МСК КМ в статичных условиях в течение 1 суток, всего поставлено 5 опытов.

На внутренней поверхности графтов, засеянных в статичных условиях, через 1 сут. культивирования видны островки клеток без их инфильтрации вглубь сосудистой стенки (Рисунок 32).

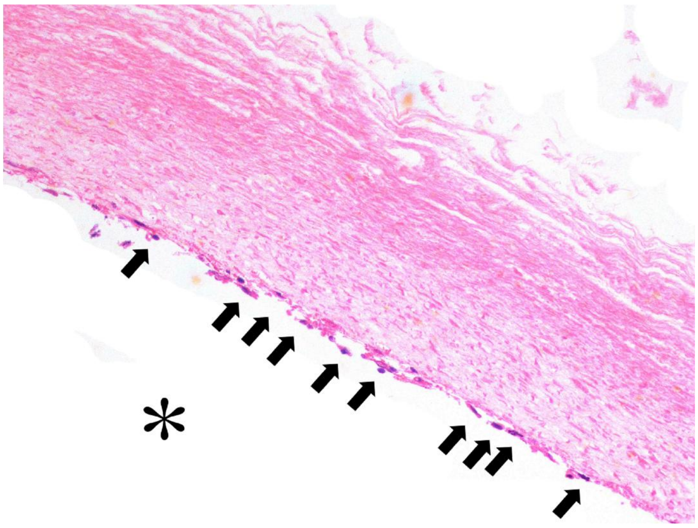


Рисунок 32 - Микрофотография поперечного среза графта, засеянного в статичных условиях, окраска гематоксилином и эозином, увеличение х200. Звездочкой обозначен просвет. Видны островки клеток на внутренней поверхности графта (ядра клеток обозначены стрелками).

3.10.3 Результаты доставки клеток с помощью центробежной силы

В экспериментах этого раздела изучали засев графтов, заполненных суспензией МСК КМ, с помощью кратковременного центрифугирования и с их последующим культивированием в статичных условиях в течение 1 суток. Всего проведено 9 опытов с различными параметрами вращения (меняли длительность и скорость вращения).

В результате центрифугирования со скоростью 1000 и 2000 об./мин. стенка сосудистого кондуита истончалась (растягивалась), менялась характерная пористая микроструктура матрикса. Эффективность засевания составила 18,6 % и 21,5% при 1000 и 2000 об./мин., соответственно. При исследовании микропрепаратов видны ядра клеток, которые оказались как бы «размазаны» по внутренней поверхности кондуита, без какой-либо инвазии вглубь его стенки (Рисунок 33). При скорости вращения 6000 об./мин. графт сильно перекручивался, деформировался и становился непригодным для дальнейшего использования (оценка эффективности засевания и гистологическое исследование не проводились).

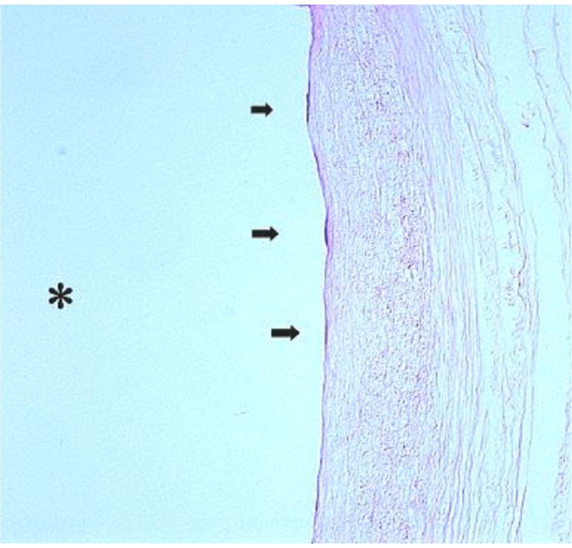


Рисунок 33 - Микрофотография поперечного среза графта, засеянного с помощью центробежной силы (1000 об./мин. в течение 5 мин.), окраска гематоксилином и эозином, увеличение х200. Звездочкой обозначен просвет. Клетки (обозначены стрелками) распластаны на внутренней поверхности графта, без проникновения вглубь истонченной сосудистой стенки.

3.10.4 Результаты доставки клеток с помощью разницы давлений

В экспериментах этого раздела изучали засев ДАП, заполненных суспензией МСК КМ, в условиях отрицательного давления снаружи графтов в течение от 5 до 20 мин. и с их последующим культивированием в статичных условиях в течение 1 суток. Всего проведено 8 опытов.

Расчёт эффективности засевания показал адгезию менее 10% клеток на поверхности ДАП. Во всех исследуемых препаратах микроскопически картина ДАП, ядра клеток не видны (Рисунок 34).

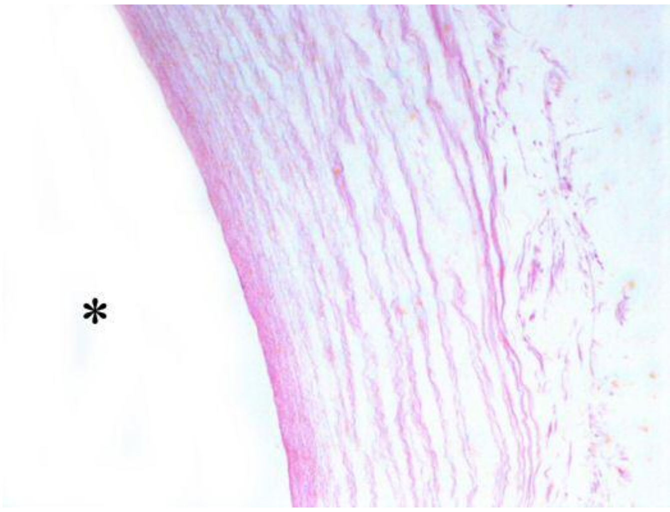


Рисунок 34 - Микрофотография поперечного среза графта, засеянного в условиях отрицательного давления (экспозиция 20 мин.), окраска гематоксилином и эозином, увеличение х200. Звездочкой обозначен просвет. Ядра клеток не видны.

Таким образом, использование отрицательного давления не дало ожидаемых результатов: клетки не только не проникали вглубь стенки, но даже не успевали фиксироваться на графте за период до 20 мин.

3.11 Результаты рецеллюляризации в проточном биореакторе по сравнению со статичным культивированием

В 24 экспериментах этого раздела проводили засев МСК КМ и МСК ЖТ на ДАП в статичных условиях. Далее часть сосудов (группа I, n=18) культивировали в статичных условиях от 5 до 21 сут., другую часть сосудов (группа II, n=6) в оригинальном проточном биореакторе в течение 5 сут. По окончании рецеллюляризации изучали гистологические срезы, окрашенные гематоксилином и эозином. Кроме того, благодаря предварительной метке МСК витальным красителем *PKH26*, была возможна визуализация клеток в стенке сосуда без дополнительных методов окрашивания, а с помощью другого флюоресцентного красителя *CFSE* удалось оценить их жизнеспособность.

Количество клеток в поле зрения участка сосуда, рецеллюляризованного в статичных условиях (группа I), через 5 сут. культивирования составило 16,0±3,4, через 14 сут. - 17,5±4,4, через 21 сут. - 15,8±4,9 (достоверных отличий нет). В графтах, рецеллюляризованных в проточном биореакторе (группа II), аналогичный показатель был существенно выше и после 5 сут. перфузии сосудов в биореакторе составил 27,9±6,0.

Средняя доля живых клеток в группе I составила 81,3 ± 4,2 %, 74,5 ± 4,6 % и 75,8 ± 4,3 % через 5 сут., 2 и 3 недели соответственно. Снижение жизнеспособности клеток при культивировании более 5 сут. являлось статистически достоверным.

При культивировании тканеинжненерного сосуда в биореакторе доля жизнеспособных клеток (группа II) была выше, чем в статичных условиях, и составляла 89.3 ± 5.9 % (Рисунок 35; различие достоверно).

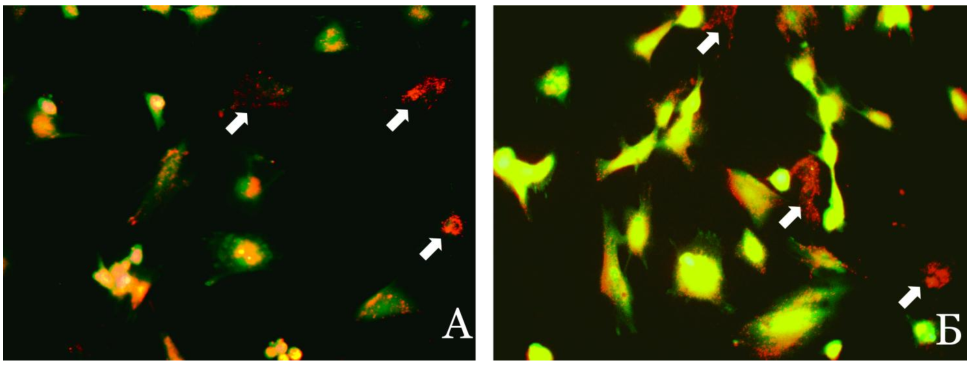


Рисунок 35 - Микрофотография внутренней поверхности сосудистого кондуита через 5 сут. культивирования в статичных условиях (А) и в проточном биореакторе (Б). Двойная окраска *PKH26* (красный) и *CFSE* (желто-зеленый), увеличение x200. Мертвые клетки обозначены стрелками

При гистологическом исследовании установлено наличие клеток на внутренней поверхности всех 24 исследуемых сосудов.

В образцах группы I чаще всего наблюдали образование монослоя клеток без их проникновения вглубь сосудистой стенки. ВКМ практически не изменялся. С увеличением времени культивирования не отмечено значимой динамики гистологической картины (Рисунок 36-А, Б, В).

В образцах группы II отмечено образование до нескольких слоев клеток на внутренней поверхности графта, в некоторых местах наблюдалась инфильтрация клеток вглубь сосудистой стенки, которая была более компактной, чем при культивировании сосудов в статичных условиях (Рисунок 36-Г).

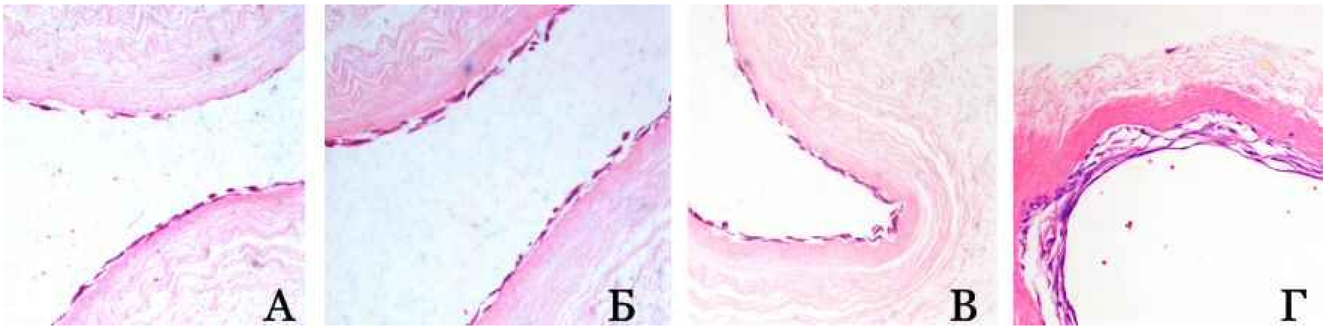


Рисунок 36 - Микрофотография поперечного среза сосудистого кондуита, рецеллюляризованного в статичных условиях (А – 5 сут.; Б – 14 сут.; В – 21 сут.) и в проточном биореакторе (Г – 5 сут.). Окраска гематоксилином и эозином, увеличение х200.

Отдельно следует отметить, что при получении культуры МСК крысы отмечена более быстрая пролиферация МСК ЖТ на культуральном пластике по сравнению с МСК КМ (время, необходимое клеткам одного пассажа для достижения субконфлюентности монослоя было меньше для МСК ЖТ). Однако при рецеллюляризации ДАП достоверных различий в гистологической картине при использовании МСК КМ и МСК ЖТ не обнаружено (соотношение графтов, засеянных МСК этих двух типов в каждой группе 1:1).

Таким образом, культивирование ДАП, засеянных МСК, в оригинальном проточном биореакторе в течение 5 сут. позволило достичь лучших результатов по сравнению с культивированием аналогичных графтов в статичных условиях. Этот способ изготовления ТИКС и был нами применен при проведении экспериментов *in vivo*.

3.12 Результаты имплантации графтов *in vivo*

Однократно (в качестве отдельного эксперимента) была имплантирована ДАП, которая не была предварительно ушита (Рисунок 37). При этом стало ясно, что анастомозирование сосудов возможно, несмотря на явное несоответствие их диаметров. Но турбулентный ток крови в

расширенном участке кровеносного русла создавал повышенный риск тромбоза шунта и возможно привел бы к ложным результатам. Поэтому мы использовали методику предварительного уменьшения диаметра исследуемых сосудов, что несколько увеличивало объем работы, но облегчало наложение анастомозов и исключало указанные нарушения тока крови по трансплантату.

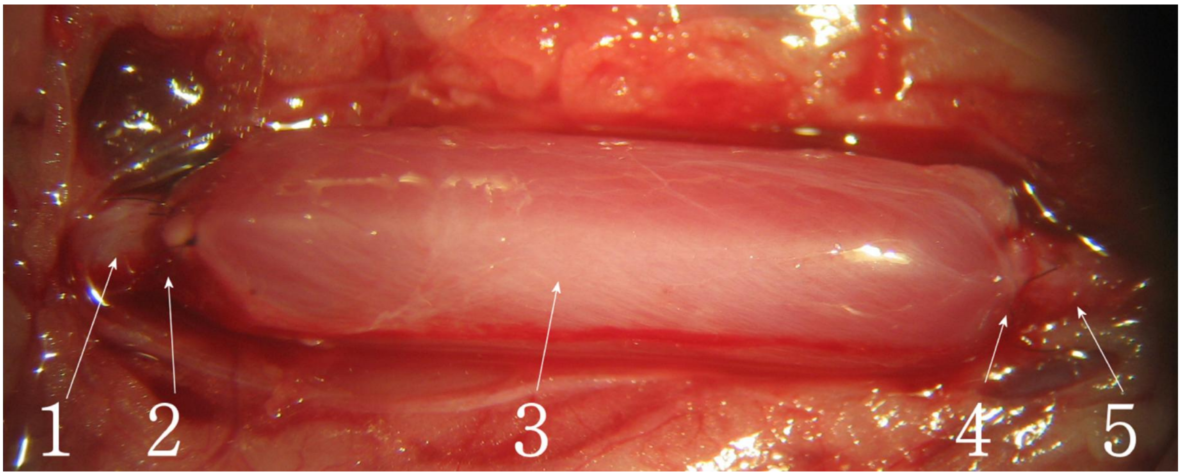


Рисунок 37 - Фотография имплантированной ДАП, которая не была предварительно ушита (фото сделано сразу после запуска кровотока). 1-бифуркация аорты, 2-дистальный анастомоз, 3-децеллюляризованная артерия, 4-проксимальный анастомоз, 5 - аорта в области почечных артерий. Отчетливо видна разница диаметров нативной аорты крысы и децеллюляризованной артерии пуповины при физиологическом уровне артериального давления.

Всего проведено 25 опытов. 5 животным имплантировали аорту другой крысы (группа 1, контроль), 10 - децеллюляризованную артерию пуповины, незасеянную клетками (группа 2) и еще 10 имплантировали ТИКС, засеянный МСК и культивированный в проточном биореакторе в течение 5 сут. (группа 3).

Следует отметить, что в процессе имплантации артерии пуповины оказались удобны при исполнении всех необходимых манипуляций: легко захватывались и удерживались микропинцетом, игла без существенного сопротивления проходила сквозь стенку сосуда, в местых прокола кровотечение отсутствовало. Длительность операции составила 120 ± 15 мин., время пережатия аорты 55 ± 15мин., достоверной разницы по этим показателям между использованием различных видов имплантируемых сосудов не было. На каждый анастомоз было наложено от 8 до 10 отдельных узловых шва (Рисунок 38). Непосредственнно после запуска кровотока все шунты были проходимы. Кровопотеря при запуске кровотока в области анастомозов была минимальной, останавливалась кратковременным локальным прижатием. В ряде случаев потребовалось наложение дополнительных швов. Протекания крови сквозь стенку сосудистых кондуитов не было.

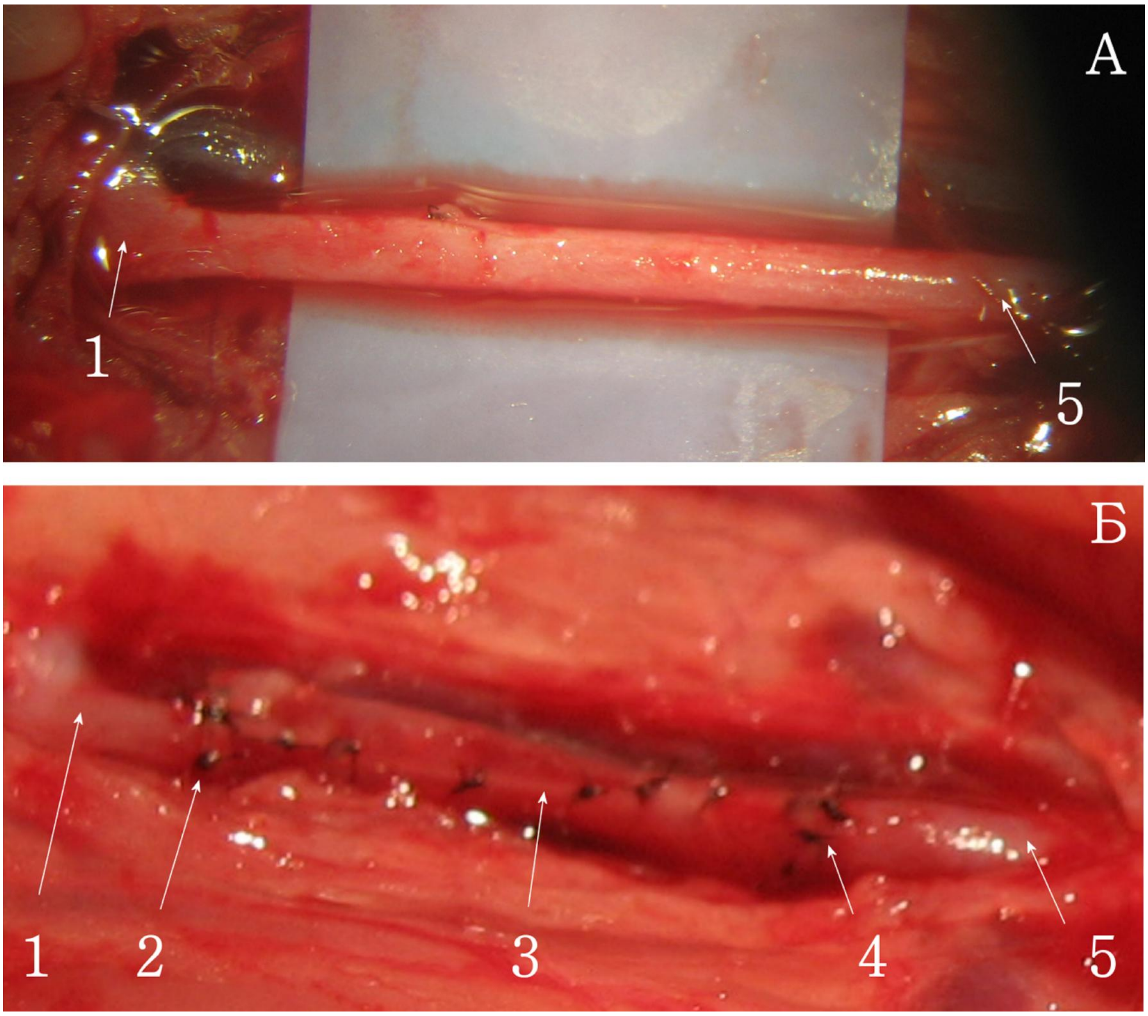


Рисунок 38 - Фотография нативной аорты крысы (А), имплантированного ТИКС (Б), диаметр которого уменьшен (фотографии сделаны сразу после запуска кровотока). 1-бифуркация аорты, 2-дистальный анастомоз, 3-ТИКС, 4-проксимальный анастомоз, 5 - аорта в области почечных артерий.

Во всех опытах операции прошли без осложнений. Большинство животных в первые двое суток были сонливы, двигались в клетке мало. Затем они восстанавливали свою активность, вели себя так же, как и до операции, изменений в поведении животных до окончания опыта не зафиксировано.

При эксплантации графтов не было выявлено их аневризматечкого расширения. Макроскопически отмечено образование рыхлой рубцовой ткани в зоне операции во всех трех группах исследования.

В группе 1 (контроль) все 5 крыс оставались живы до 30 сут. после операции. Имплантированные сосуды этой группы были проходимы, несмотря на их аллогенное происхождение.

В группе 2 (незасеянные ДАП) 3 крысы погибли в первые 3 сут. после операции, во всех случаях в просвете имплантированного сосуда обнаружен тромб. Одна погибла на 7-е сутки от

инфекционных осложнений (нагноение послеоперационной раны), исключена из исследования и при анализе проходимости не учитывается. У 4 из 6 оставшихся животных этой группы сосудистые кондуиты тромбировались в различные сроки в течение месяца после имплантации. При этом видимые проявления тромбоза шунта (задний парапарез) развились лишь у двух крыс (50%).

В группе 3 (ТИКС, предварительно засеянные МСК и прекультивированные в биореакторе) одно животное без признаков тромбоза ТИКС выведено из эксперимента на 2-е сут. после операции для изученя клеточного состава сосудистой стенки в раннем послеоперационном периоде. Это животное не учитывали при расчёте показателя проходимости графтов. Остальные 9 крыс оставались живы до 30 сут. после операции, парапарезов не было. При выведении отмечен тромбоз 1 из 9 имплантированных ТИКС.

Таким образом, ТИКС, засеянные аллогенными МСК (группа 3), показали значительно более высокий уровень проходимости (8 из 9 графтов проходимы) по сравнению с незасеянными сосудистыми кондуитами (группа 2), где только 2 из 9 сосудов оставались проходимы в течение 30 сут. (Рисунок 39).

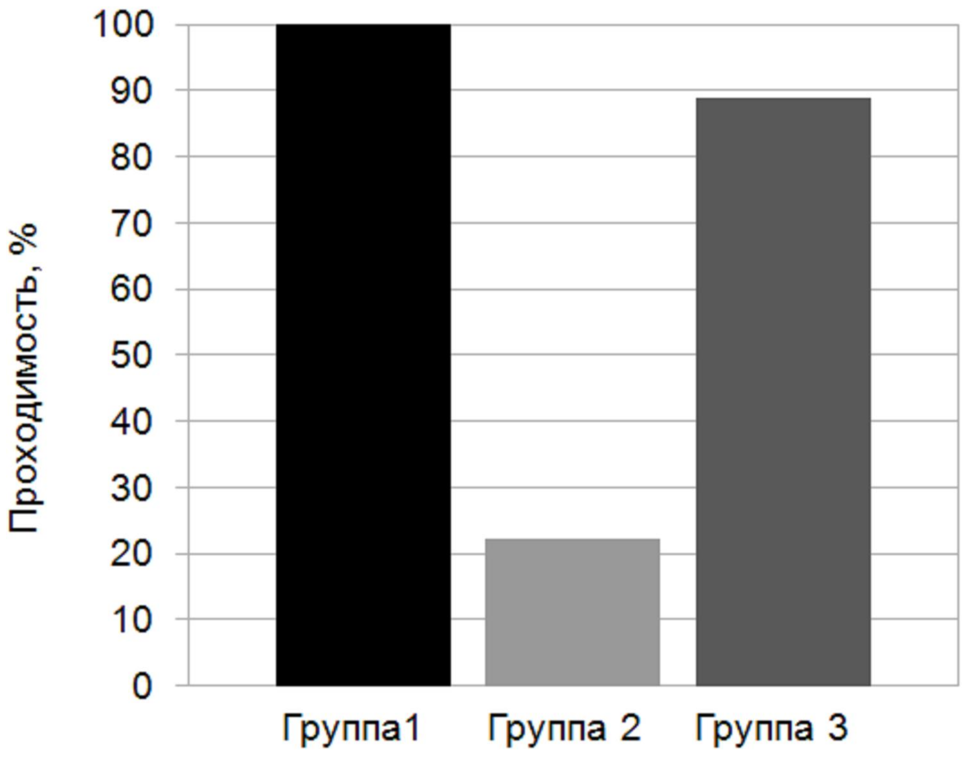


Рисунок 39 - Проходимость имплантированных сосудов.

Группа 1 (контроль) - аллогенные нативные аорты крысы (5/5);

Группа 2 – незасеянные децеллюляризованные артерии пуповины (2/9);

Группа 3 – тканеинженерные кровеносные сосуды, засеянные аллогенными МСК (8/9).

Гистологическая картина нативной аорты крысы представлена на Рисунок 40.

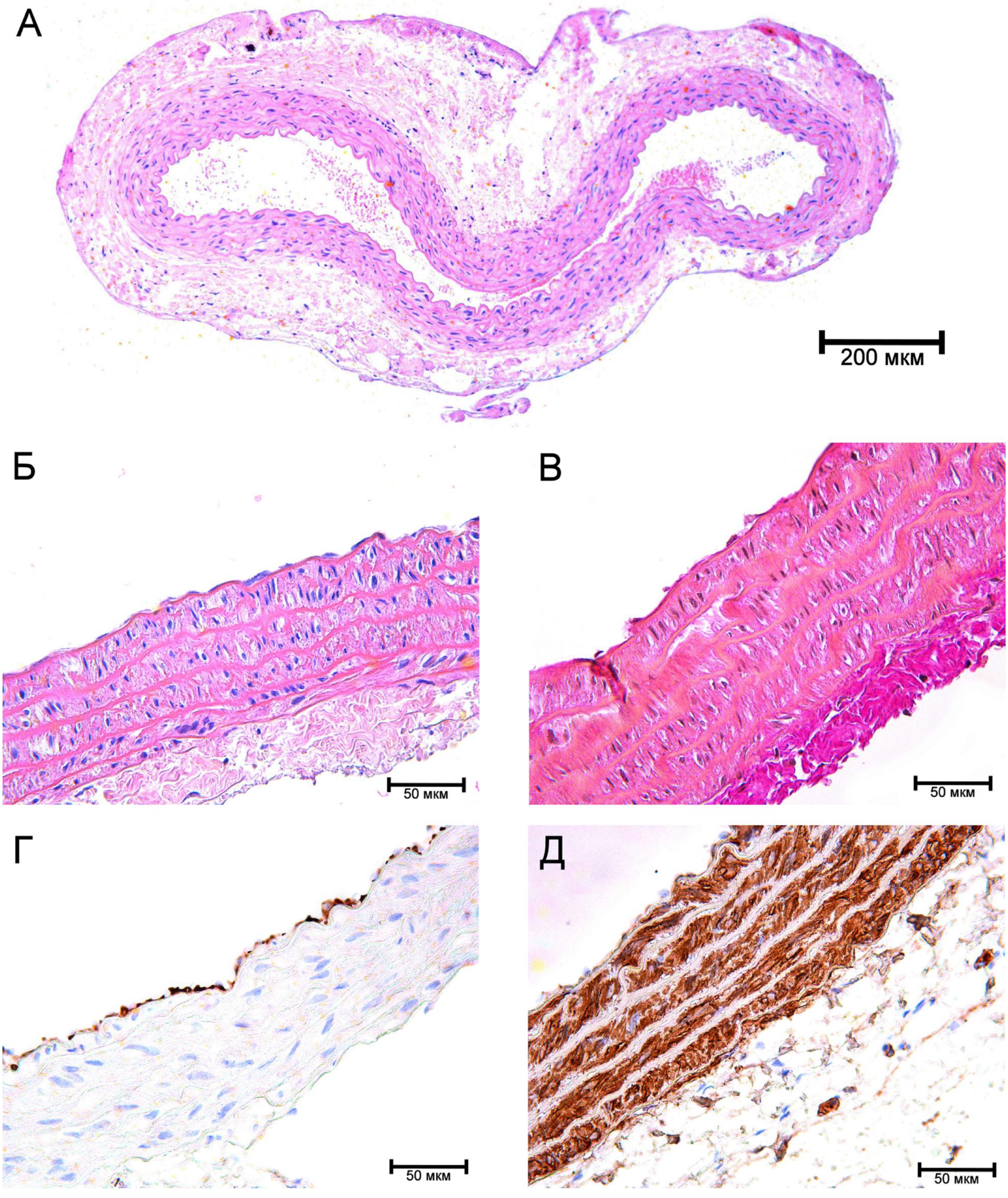


Рисунок 40 - Микрофотографии нативной аорты крысы.
А-Б - окраска гематоксилином и эозином; В - окраска по Ван-Гизону; Г - ИГХ с антителами к CD31; Д - ИГХ с антителами к α-SMA. А - увеличение x100; Б-Д - увеличение x400, просвет сосуда находится сверху.

При морфологическом исследовании сосудов группы 2 и 3 отмечена богатая инфильтрация стенки графтов клетками. Судя по их морфологии и расположению, можно предположить, что это – фибробласты или миофибробласты.

В просвете 7 графтов группы 2 отмечено наличие окклюзирующего тромба, в большинстве случаев сочетающееся с утолщением сосудистой стенки и сужением просвета (Рисунок 41 - А). Остальные 2 из 9 сосудистых кондуитов этой группы, были проходимы, но при гистологическом исследовании также отмечена выраженное увеличение толщины стенки графтов (Рисунок 41 - Б).

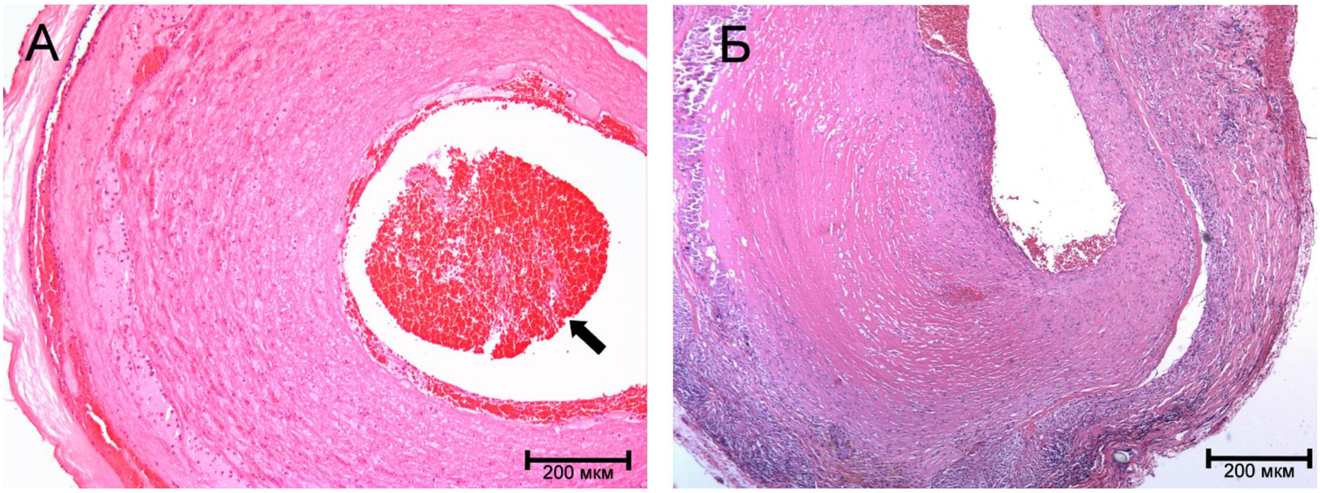


Рисунок 41 - Микрофотография поперечных срезов незасеянного кондуита (группа 2). А – Утолщение сосудистой стенки и тромбоз графта на 4-е сут. после имплантации, стрелкой указан тромб в просвете сосуда. Б – Графт проходим на 30-е сут. после имплантации, но отмечена выраженная гиперплазия стенки. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение х100.

В группе 3 клетки реципиента инфильтрировали стенку ТИКС с наружной стороны, формируя ткань, напоминающую адвентицию и средний слой нормального сосуда (Рисунок 42, Рисунок 43 – А, Б). К 30-м суткам стенка ТИКС богато инфильтрирована клетками с четким разделением на внутренний монослой, средний и наружный слои (Рисунок 42, Рисунок 43 – Б, Г, Е, З).

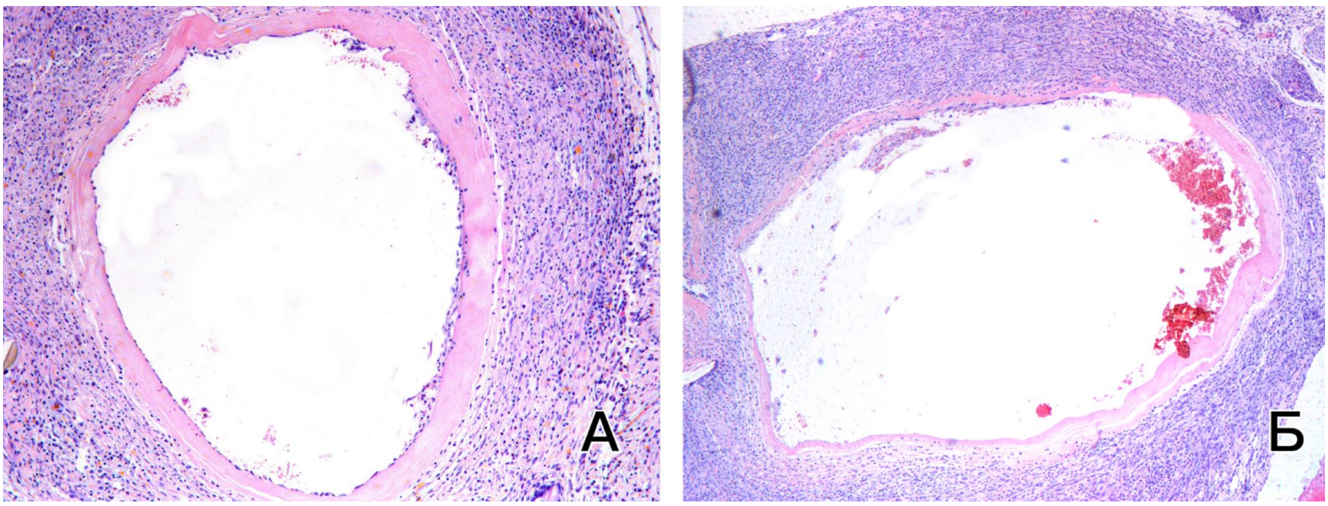


Рисунок 42 - Микрофотографии поперечных срезов ТИКС: А – через 2 сут. и Б – через 30 сут. после имплантации. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение х100.

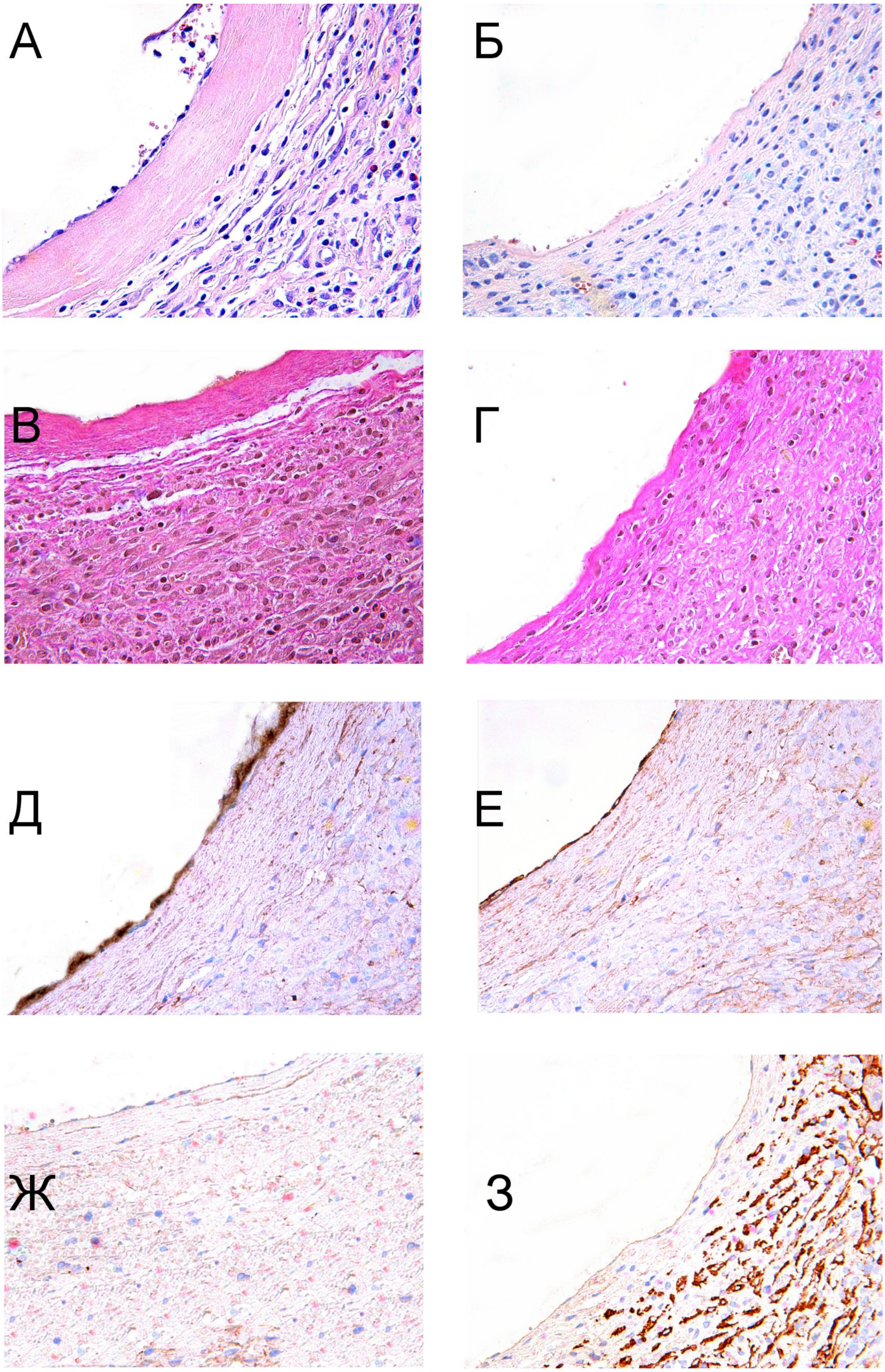


Рисунок 43 - Микрофотографии поперечных срезов ТИКС: А,В,Д,Ж – через 2 сут. и Б, Г, Е, З – через 30 сут. после имплантации. А, Б - окраска гематоксилином и эозином; В, Г - окраска по Ван-Гизону. Д, Е – ИГХ-исследование на антиген CD31. Ж, З – ИГХ-исследование на антиген α-SMA. Увеличение х400.

Гистологическая картина всех 8 проходимых к 30-м сут. ТИКС в группе 3 одинаковая.

На препаратах, окрашенных по Ван-Гизону, отмечено сохранение богатого коллагеном ВКМ через 30 сут. (Рисунок 43 – В, Г). Клетки, выстилающие внутреннюю поверхность ТИКС, имели положительную ИГХ-окраску на антиген CD-31, характерный для эндотелиальных клеток как через 2 сут., так и через 30 сут. после имплантации (Рисунок 43 - Д, Е). Клетки хозяина, привлеченные в стенку сосудистого кондуита в большом количестве уже на 2-е сут. после имплантации не экспрессировали α-SMA (Рисунок 43 – А, Ж). Вероятный фенотип этих клеток – фибробласты или прогениторные клетки, например МСК. Однако, к 30-м сут. эти клетки окрашивались при ИГХ-реакции с антителами к α-SMA (Рисунок 43 – Б, З), что в совокупности с их морфологией и взаимным расположением позволяет говорить, что вероятнее всего это - миофибробласты. Таким образом, структура всех 8 засеянных графтов группы 3 через 30 сут. после имплантации изменилась и напоминала строение нативной артерии.

В препарате ТИКС через 2 суток после имплантации продолжали визуализироватсья аллогенные МСК, предварительно меченные *PKH26* и засеянные на графт до имплантации. Следует отметить значительное уменьшение их количества и яркости свечения красителя по сравнению с препаратом ТИКС до имплантации (Рисунок 44 - А, Б). В препаратах ТИКС, эксплантированных через 30 сут. после операции, меченых клеток не обнаружено (Рисунок 44 - В).

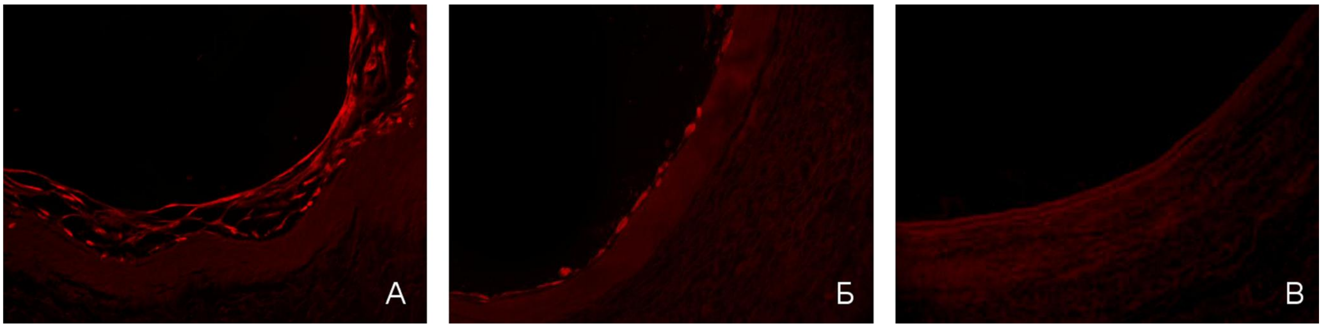


Рисунок 44 - Микрофотографии поперечного среза ТИКС. А- до имплантации; Б - через 2 суток после имплантации; В - через 30 сут. после имплантации. Флюоресценция в красном спектре, увеличение х40. На панелях А и Б на внутренней поверхности сосуда видны клетки, меченые прижизненным красителем *PKH26*.

4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1 Преимущества использования децеллюляризованных артерий пуповины в качестве основы тканеинженерого сосуда малого калибра

Последние достижения тканевой инженерии во многом связаны с появлением возможности создания ВКМ органов и тканей методом децеллюляризации. Децеллюляризованные ткани сохраняют механическую прочность и нативную структуру, что делает их подходящим субстратом для последующего заселения клетками реципиента. Качеству удаления клеток из ткани уделяется огромное внимание, поскольку именно это обеспечивает отсутствие иммунного ответа у реципиента (Crapo P.M. et al., 2011). Выбор оптимальной методики децеллюляризации сильно отличается в зависимости от вида обрабатываемой ткани. В нашей лаборатории разработан оригинальный способ удаления клеток из стенки кровеносных сосудов малого калибра, в качестве которых в эксперименте использовали АП человека.

Первыми обратили внимание на возможность использования артерий пуповины в качестве субстрата для изготовления ВКМ кровеносных сосудов малого калибра человека Gui L. et al. (2009). Авторами была показана возможность децеллюляризации и последующей рецеллюляризации с помощью *HUVEC*. Кроме того были исследованы механические свойства ДАП и поставлены опыты по имплантации ДАП в аорту крысы. Однако, дальнейшего развития этой идеи в доступной литературе не обнаружено. Следует признать, что АП изучены мало, однако, на наш взгляд, они имеют ряд достоинств, что делает их использование очень перспективным. Прежде всего, пуповина легко доступна и её получение не вызывает этических проблем, так как чаще всего она утилизируется. Кроме того, при родоразрешении при помощи кесарева сечения, пуповина может быть получена в стерильном виде (Hoenicka M. et al., 2008). Длина пуповины достигает 40-60 см, и, соответственно, обе артерии проходящие в ней, могут быть легко выделены на протяжении 30-50 см. У АП нет боковых ветвей, диаметр АП одинаков на всем протяжении и при физиологическом давлении (после выделения) составляет приблизительно 3,5-4,5 мм, что и требуется для шунтов, часто используемых в клинических ситуациях, например, при аорто-коронарном или бедренно-подколенном (бедренно-тибильном) шунтировании.

Препарирование артерий не сложно, несмотря на «нежность» их стенки и малый диаметр сосуда. С использованием стандартного хирургического инструментария - пинцета и ножниц - возможно выделение большого количества материала в течение короткого периода времени.

У АП отсутствует адвентиция – её роль выполняет Вартонов студень. Возможно, именно из-за отсутствия этого внешнего слоя артерии клетки хозяина могут легко проникать из окружающей ткани в стенку сосуда. На препаратах, сделанных на 2-е сут. после имплантации

уже определяется большое количество клеток в сосудистой стенке. По нашему мнению это имеет важное значение для ремоделирования ТИКС *in vivo* и выгодно выделяет АП среди других материалов для изготовления основы тканеинженерных сосудов.

4.2 Поиск оптимального способа децеллюляризации артерий пуповины

В настоящей работе для децеллюляризации АП использована комбинация детергентов и ферментов, так поступали и другие исследователи, однако разработанный способ отличается составом, последовательностью и длительностью применения децеллюляризирующих агентов, их более низкой концентрацией и использованием дополнительного физического воздействия – вибрации. В таком сочетании методы, ведущие к удалению клеток из ткани, ранее никем не были использованы. В то же время именно это по нашему мнению определило результат.

На первом этапе, при отмывании участка кровеносного сосуда от крови в деионизированной воде, которая является гипотоническим раствором, происходит осмотический шок и частичный лизис клеток. Непродолжительное трехкратное (по 10-15 мин. после каждого этапа) промывание обрабатываемой артерии в ФСБ направлено на механическое удаление свободного клеточного дебриса. На втором этапе использован 0,05% раствор трипсина с ЭДТА, который широко применяется в клеточной биологии для отделения клеток от поверхности субстрата (пластик, стекло). Обычно для этих целей пользуются раствором трипсина в концентрации 0,05% или 0,25%. Нами применена более низкая концентрация раствора этого фермента для предотвращения протеолиза белков ВКМ. Трипсин приводит к отделению клеток от ВКМ и «разрыхлению» его микроструктуры, способствует глубокому проникновению детергентов и улучшению удаления клеток из толщи сосудистой стенки на дальнейших этапах децеллюляризации. ЭДТА связывает ионы Ca^{2+} и Mg^{2+}, которые, во-первых, могут ингибировать действие трипсина, во-вторых необходимы для адгезии клеток на ВКМ, и в-третьих ЭДТА неселективно ингибирует металлопротеиназы матрикса, что предотвращает саморазрушение ВКМ.

На третьем этапе обработки материала использовали 0,075% раствор додецилсульфата натрия. Лаурилсульфат натрия (*SLS*; также додецилсульфат натрия, *SDS*) — сильное анионоактивное поверхностно-активное вещество, которое применяется для солюбилизации белков клеточных мембран и лизиса клеток с последующим вымыванием клеточного дебриса из матрикса. Судя по литературе, обычно для проведения эффективной децеллюляризации используют додецилсульфат натрия в концентрации от 0,075% до 1%. Мы применили самую малую эффективную концентрацию этого детергента для сохранения ВКМ и максимального снижения возможного токсического эффекта при будущем посеве клеток на полученный ВКМ.

Четвертый этап обработки материала 0,25% раствором тритон Х-100 направлен также на

солюбилизацию клеточных белков и лизис клеток с последующим вымыванием клеточного дебриса из ВКМ, а также для удаления остатков додецилсульфата натрия, который может оказаться цитотоксичным при последующей рецеллюляризации. По данным литературы, рекомендуется использовать 1% концентрацию данного реагента (Roy S. et al., 2005; Ахмедов Ш.Д. и др., 2009; Williams C. et al., 2009; Zou Y., Zhang Y., 2012). Нами установлено, что минимально эффективная концентрация тритон X-100, при прочих равных условиях составляет 0,25%. Эффективность децеллюляризации с применением только 1% раствора тритон X-100, либо только раствора додецилсульфата натрия в различных концентрациях, оказалось недостаточной, что соответствует данным литературы (Rieder E. et al., 2004; Fitzpatrick J.C. et al., 2010). Комбинация анионного и неионного детергентов является оптимальной (Rieder E. et al., 2004; Roy S. et al., 2005; Ахмедов Ш.Д. и др., 2009).

Техника заключительной части децеллюляризации одинакова практически у всех исследователей. Этот этап направлен на разрушение нуклеиновых кислот с помощью нуклеаз, которые ответственны за иммунный ответ в организме хозяина. Данные гистологического и ИГХ анализа, а также отсутствие ДНК и РНК в ДАП свидетельствуют о полном удалении клеток, клеточного дебриса и нуклеиновых кислот из обрабатываемой ткани в нашем варианте протокола децеллюляризации.

На разработанный способ децеллюляризации был получен патент РФ на изобретение №2504334, который гарантирует приоритет разработки данной методики.

Таким образом, было достигнуто эффективное удаление клеток, клеточного дебриса и нуклеиновых кислот (ДНК и РНК), что исключает возможный иммунный ответ после трасплантации тканеинженерного сосуда реципиенту. ВКМ, состоящий преимущественно из соединительно-тканных белков, таких как коллаген и эластин, сохраняет свою естественную структуру, и предполагалось, что в связи с этим он окажется максимально благоприятной базой для последующей колонизации клетками реципиента.

Дополнительным подтверждением сохранности ВКМ стали результаты механических испытаний ДАП.

4.3 Децеллюляризованные артерии пуповины сохраняют свои механические свойства

В ходе настоящего диссертационного исследования были впервые определены механические свойства АП до и после децеллюляризации. В доступной литературе найдена всего одна статья, где описаны упруго-эластические свойства АП человека (Gui L. et al., 2009). Наши данные коррелируют с тем, что получено авторами публикации при измерении пикового давления, в тоже время для определения зависимости нагрузки-деформации ими была

использована другая методика, основанная на фиксации изменений диаметра сосуда под нагрузкой, что не позволяет напрямую сравнивать результаты. Биаксиальная методика, использованная нами, является классической и универсальной, и её чаще применяют для изучения механических свойств материалов. Исследование устойчивости к прорезыванию шовного материала было проведено, судя по литературе, нами впервые. Полученные результаты представляют большой интерес, так как механические свойства будущего тканеинженерного сосуда, которые влияют на его проходимость, подверженность аневризмообразованию при последующей трасплантации в кровеносное русло в экспериментах *in vivo*, зависят от характеристик ВКМ ДАП.

Сохранение механических свойств децеллюляризованных сосудов в ходе их хранения важно с точки зрения удобства работы и уменьшения времени на получение готового тканеинженерного графта. Нами была опробована методика криоконсервирования децеллюляризованных артерий, но она приводила к значимому снижению прочности сосуда после размораживания, возможно из-за повреждения структуры ВКМ кристаллами льда. В итоге мы от неё отказались и использовали способ, ранее предложенный Dahl S.L.M. et al. (2011), которые описали хранение децеллюляризованных сосудов в стерильном ФСБ при температуре +4^{o}C до 12 мес. без видимого разрушения ВКМ и, соответственно, сохранением прочности. Наши результаты также позволяют утверждать, что децеллюляризованные сосуды могут храниться таким образом достаточно долгое время (не менее 10 мес.) без изменения механических свойств.

При проведении испытаний на прочность, обнаружено, что ДАП не подвергаются разрушению при давлении внутри сосуда значительно выше физиологического (Рисунок 26).

Следует отметить разную толщину сосудистой стенки до и после обработки, выражающуюся, в увеличении внутреннго диаметра сосуда (т.е. его просвета) при сохранении внешнего, что, возможно, связано с удалением клеточных элементов из стенки артерии. Испытание на разрывной машине показало, что ДАП сохраняют свою прочность, но при этом становятся более растяжимыми. При практически одинаковой максимальной нагрузке, деформация ДАП была в 1,5 раза больше, чем нативных артерий. Причем динамика растяжения больше различается при низкой нагрузке, что возможно связано с отсутствием ГМК в сосудистой стенке ДАП, обеспечивающих базальный тонус артерии. С повышением нагрузки сопротивление деформации обеспечивается в основном коллагеновыми волокнами ВКМ и угол наклона кривых зависимости напряжение-деформация сравнивается (Рисунок 27), отражая, таким образом, интактную структуру матрикса.

При растяжении образцов в поперечной плоскости, максимально выдерживаемая нагрузка оказалась существенно выше, чем при растяжении в продольном направлении, во всех трёх

группах, равно как и изменение длины сосудов относительно исходной, что, очевидно, связано с большей площадью поперечного сечения образцов и увеличенным сопротивлением ВКМ. При этом угол наклона кривых зависимости напряжение-деформация практически совпадает (Рисунок 28). Полученные данные позволяют говорить о том, что децеллюляризация не меняет значимо упруго-эластические свойства АП.

ДАП также сохраняют устойчивость к прорезыванию шовным материалом. При этом помимо легкости наложения шва отмечено удобство работы с сосудом, что является несомненным достоинством испытуемого материала при исследовании его в эксперименте и, возможно, использовании в клинике.

4.4 Засевание клеток на децеллюляризованные артерии пуповины

Известно, что остатки детергентов, используемых в процессе децеллюляризации, обладают цитотоксическими свойствами и могут стать причиной отсутствия роста клеток на обработанной ткани (Cebotari S. et al., 2010). Для снижения концентрации остатков децеллюляризирующих агентов, ДАП многократно отмывали в большом количестве ФСБ. Кроме того, ДАП за сутки до рецеллюляризации помещали в культуральную среду. Отдельный тест на цитотоксичность ДАП не проводили. Однако доказательством отсутствия негативного влияния ДАП на клетки являлся рост МСК на поверхности матрикса при проведении экспериментов по рецеллюляризации, и высокий уровень жизнеспособности этих клеток.

МСК обладают такими ключевыми свойствами, как высокая пролиферативная активность и способность к дифференцировке в различные типы специализированных клеток. При этом они легко могут быть получены в необходимом количестве в аутогенном варианте, в отличие от *HUVEC* и стволовых клеток пуповинной крови, что в совокупности делает использование МСК для создания ТИКС привлекательным для многих исследователей (Cho S.-W. et al., 2005; Zhao Y. et al., 2010; Krawiec J.T., Vorp D.A., 2012). Известна также антитромбогенная активность МСК (Hashi C.K. et al., 2007).

В ходе выполнения работы использованы МСК из двух источников – костного мозга и жировой ткани одной крысы. При экспансии культуры МСК отмечена более быстрая пролиферация МСК ЖТ на культуральном пластике по сравнению с МСК КМ, - что соответствует данным литературы (Dmitrieva R.I. et al., 2012). Однако при рецеллюляризации ДАП различий в результатах между использованием МСК КМ и МСК ЖТ не обнаружено.

Первые опыты по рецеллюляризации ДАП, которые были проведены нами, подтвердили возможность роста МСК на АП, обработанных описанным способом. Далее одной из первоочередных задач стало определение оптимального количества МСК в клеточной суспензии. Объем её, вводимый в просвет ДАП был постоянен и равнялся 100 мкл.

Эмпирическим путем было подобрано лучшее количество МСК ($1x10^6$ клеток), и этот вариант использовали во всех дальнейших экспериментах.

Апробированы два способа «динамической» доставки клеток на носитель, которые используются в тканевой инженерии кровеносных сосудов (Villalona G.A. et al., 2010). В частности, Godbey W. et al. (2004) показали, что совмещение ГМК и фибробластов с крупнопористым носителем из ПГК с помощью центрифугирования позволяет в течение 10 мин добиться трехкратного увеличения эффективности заселения по сравнению со статичным методом. Подобный подход был также использован позже и другими исследователями (Roh J.D. et al, 2007; Ng R. Et al., 2010). Однако, серия наших экспериментов с варьированием параметров центрифугирования, не показала лучшего проникновения клеток вглубь сосудистой стенки по сравнению со статичным засеванием[1]. Более того, центрифугирование сосудов при скорости вращения более 2000 об/мин приводило еще и к их сильному перекручиванию. Эффективность же засевания оказалась ниже, чем при статичном способе.

Solchaga L. et al. (2006) описали использование отрицательного давления для совмещения МСК с синтетическим носителем из кополимера ПГК. Это позволило авторам за 10 мин. повысить эффективность засевания минимум в 2 раза по сравнению со статичным методом в течение 72 ч. В нашем случае эта методика также не привела к повышению эффективности засевания: после 20 мин. воздействия разрежением окружающей среды, клетки, возможно, не успевали фиксироватсья на поверхности ДАП. Более длительное время нами не исследовано в связи с возможным негативным влиянием на клетки отсутствия газообмена в герметичной камере.

Таким образом, «динамические» способы быстрого внедрения клеток посредством центрифугирования и вакуумирования, подходящие для крупнопористых носителей из синтетических полимеров, оказались неприменимы для заселения клетками децеллюляризованного матрикса сосудов возможно из-за малого размера пор и гидродинамического сопротивления ткани. Дальнейшего исследования этих методов не проводили. В поисках способа улучшения результатов рецеллюляризации ДАП мы пробовали увеличить время культивирования, но это привело лишь к снижению доли жизнеспособных клеток без увеличения их общего количества.

Для улучшения результатов рецеллюляризации, было решено использовать комбинацию статического метода доставки клеток с последующей перфузией сосудистого кондуита в биореакторе.

---

[1] Нами для оценки достоинств методики центрифугирования применительно к ДАП был сконструирован специальный ротор к имеющейся лабораторной мультифункциональной центрифуге

4.5 Использование проточного биореактора улучшает результаты рецеллюляризвации

Известно, что клеточной адгезии, дифференцировке и созреванию клеток, формированию собственного ВКМ способствуют факторы, воздействие которых сосуды и клетки постоянно испытывают *in vivo* (напряжение сдвига, циклическое растяжение и гидростатическое давление) (Pei M. et al., 2002). Кроме того, вследствие циркуляции культуральной среды, улучшается доставка питательных веществ к клеткам и газообмен. Поэтому для повышения результатов рецеллюляризации нами был сконструирован проточный биореактор по схеме, которую часто используют в тканевой инженерии кровеносных сосудов для воссоздания физиологических условий и механических стрессов (Pei et al., 2002).

Оригинальный биореактор, созданный нами из недорогих и доступных деталей, обеспечивает постоянную перфузию ростовой среды с заданной скоростью через просвет культивируемого сосуда. Основными отличиями от аналогов, описанных в литературе (Lyons E., Pandit A., 2005), являются наружное расположение перистальтического насоса и компактные размеры камеры биореактора, которая одновременно является также резервуаром питательной среды, что позволяет культивировать ТИКС внутри любого CO_2-инкубатора; причем в этом же инкубаторе могут одновременно размещаться и другие культуральные плашки. Сужая выходную трубку из камеры биореактора (стеноз), мы получали требуемое давление внутри ТИКС. Разработанный биореактор не формировал пульсирующий ток жидкости (это, однако, не помешало получить достаточную рецеллюляризацию). Но достигнуть пульсации можно, используя, например, клапан, периодически полностью перекрывающий просвет выходной трубки с частотой 60-80 раз в мин. или применяя специальный перистальтический насос с соответствующей функцией.

Использованный нами для отслеживания МСК флюоресцентный краситель *PKH26* связывается липидными мембранами клеток, не влияя на функциональную активность МСК. Он позволяет оценивать наличие и концентрацию клеток в рецеллюляризованном сосуде без дополнительных окрасок, что оказалось чрезвычайно удобным. Кроме того, в связи с длительным сохранением метки (по данным производителя - до 100 сут.), могла быть изучена динамика клеточного состава ТИКС в дальнейших экспериментах *in vivo*.

Для оценки жизнеспособности клеток мы использовали другой флюоресцентный краситель, а именно *CFSE* (сукцинилимидный эфир карбоксифлюоресцеина). Его особенностью является то, что он свободно проникает в цитоплазму всех клеток, но начинает флюоресцировать только после расщепления внутриклеточными эстеразами, которые функционируют лишь в живых клетках. Несмотря на то, что использование *CFSE* с такой целью ранее не описано, мы пришли к выводу, что это простой, наглядный и информативный метод

оценки жизнеспособности клеток.

С помощью перфузии сосудистого кондуита в биореакторе удалось улучшить результаты статичного заселения клеток, повысить их жизнеспособность, сократить продолжительность культивирования до 5 сут., достигая образования нескольких слоев клеток по всей внутренней поверхности графта и инфильтраци их вглубь сосудистой стенки. В конце процедуры перфузии сосудистого кондуита в биореакторе мы получили прекондиционированный ТИКС, готовый к трансплантации в артериальную позицию лабораторного животного, где ожидалась дальнейшая его перестройка в зрелый кровеносный сосуд.

4.6 Имплантация экспериментальных сосудов в аорту крыс

Нами при работе как с ДАП, так и с ТИКС отмечена пластичность полученных сосудов, удобство их обработки в местах соединения с аортой крысы, хорошая способность к накладыванию швов, отсутствие кровотечения в местах прокола иглой. Основная трудность при имплантации была связана со значительно бóльшим диаметром АП в сравнении с аортой крысы. Технически создание анастомозов всё-таки возможно, в качестве пробы подобная операция была выполнена однократно (Рисунок 37). Но турбулентный ток крови в расширенном участке кровеносного русла создавал повышенный риск тромбоза шунта и возможно вел к ложным результатам. Поэтому мы использовали методику предварительного уменьшения диаметра исследуемых сосудов, что несколько увеличивало объем работы, но облегчало наложение анастомозов и исключало указанные нарушения тока крови по трансплантату.

Отсутствие аневризматической трансформации графтов еще раз подтверждает сохранность ВКМ после децеллюляризации.

Мы проводили эксперименты на иммунокомпетентных крысах линии Вистар. При последующем иссечении имплантатов и микроскопическом их исследовании не было обнаружено проявлений реакции отторжения трансплантата. Это может быть связано с двумя причинами. Во-первых, со способностью МСК секретировать противовоспалительные цитокины, локально подавляющие иммунный ответ (Aggarwal S., Pittenger M.F., 2005). Во-вторых, с использованием клеток от крысы-донора и крыс-реципиентов-ТИКС одной линии, которые генетически очень схожи между собой (Бландова З.К. и др., 1979). При этом следует признать использованные МСК аллогенными, но в то же время близкими к аутологичным. Возможным дополнительным подтверждением этому может служить отсутствие тромбоза графтов контрольной группы (аллогенные аорты другой крысы).

Графты, засеянные МСК и культивированные в проточном биореакторе в течение 5 сут., и имплантированные *in vivo* (группа 3), в 89% случаев оставались проходимы в течение всего времени наблюдения, в их стенке отмечено появление дифференцированных клеток нормальной

сосудистой стенки, а имеено эндотелиоцитов и миоцитов.

При обсуждении результатов настояещей работы следует обратить внимание на исследование L. Gui et al. (2009), которые также имплантировали децеллюляризованные артерии пуповины крысам. В качестве контроля ими использованы нативные АП. Для исключения иммунологического конфликта они проводили эксперименты на иммунодефицитных животных. Другим важным отличием было отсутствие предварительного ушивания сосудов. В результате из 11 имплантированных ДАП 6 тромбировались в течение 8 недель наблюдения, что свидетельствует о более высокой проходимости незасенных графтов (45%) по сравнению с нашими данными (28%). Морфологические исследования проходимых через 8 недель ДАП показали, что, несмотря на утолщение сосудистой стенки, в ней присутствуют как эндотелиальные, так и гладкомышечные клетки. Учёные предположили, что предварительное засевание внутренней поверхности ДАП эндотелиальными клетками могло бы улучшить проходимость. Мы использовали для этого МСК, что в итоге не только обеспечило меньшее число тромбозов и отсутствие увеличения толщины сосудистой стенки, но и перестройку ТИКС в зрелый кровеносный сосуд.

Засеянные графты показали гораздо более высокий уровень проходимости по сравнению с незасеянными ДАП (группа 2), что, вероятно, связано с ключевой ролью МСК, адгезированными на внутренней поверхности ТИКС, несмотря на их аллогенное происхождение. Тем не менее роль МСК в ремоделировании ТИКС до конца не понятна. Возможно, они обеспечивают лишь кратковременную антитромбогенность графта, привлекая и замещаясь зрелыми и прогениторными клетками реципиента (например, из зоны анастомозов или из циркулирующей крови). Возможно, хотя и маловероятно, что отсутствие меченых клеток в стенке ТИКС к 30-м сут. вызвано активной пролифирацией МСК и соответственно разведением красителя до визуально неопределяемого уровня.

На препаратах ТИКС, эксплантированного на 2-е сутки после операции обнаружено большое количество клеток, привлеченных в зону графта с его наружной стороны. Отсутствие ИГХ реакции на α-SMA позволяет определить их фенотип как фибробласты или прогениторные клетки. Такая быстрая реакция организма, вероятно, обусловлено особенностями крысы как экспериментальной модели, известной своей способностью к быстрой регенерации.

Структура засеянных графтов через 30 сут. после имплантации напоминала строение нативной артерии. Клетки, выстилающие внутреннюю поверхность ТИКС образовали сплошной монослой и имели положительную ИГХ-окраску на антиген CD-31, характерную для эндотелиальных клеток. Средняя часть сосудистой стенки была богато инфильтрирована клетками, часть которых экспрессировала α-SMA, характерный для ГМК. Перестройка прогениторных клеток в дифференцированные миоциты обусловлена, возможно, двумя

причинами: наличием МСК в сосудистой стенке и действием микроокружения. Таким образом, можно говорить о ремоделировании ТИКС в зрелую нативную артерию в организме реципиента, который выступает в этом случае в роли идеального (с точки зрения воссоздания физиологических условий) биореактора.

Значимое различие в проходимости исследуемых сосудистых кондуитов уже через 30 сут. после операции, определели срок выведения животных из эксперимента.

Полученные оптимистичные результаты получения ТИКС на базе артерий пуповины несомненно являются предварительными и нуждаются в продолжении исследований.

4.7 Дальнейшие перспективы исследования

Создание *in vitro* кровеносного сосуда со строением нативной артерии для многих исследователей до сих пор представляется утопией и нерешаемой задачей. Однако, предложенный вариант ТИКС обладает соответствующим потенциалом ремоделирования.

Несмотря на научный характер проведённого диссертационного исследования, оно имеет и большое практическое значение. ДАП, заселённые мезенхимными стволовыми клетками реципиента, могут стать альтернативой используемым в настоящее время материалам в реконструктивной сердечно-сосудистой хирургии. Эти сосуды необходимы для таких распространенных операций как аорто-коронарное шунтирование, реваскуляризация артерий нижних конечностей, создание артериовенозных фистул для гемодиализа.

У данной работы большой трансляционный потенциал, она и нацелена на применение ТИКС у человека. АП, используемые в качестве основы ТИКС, имеют необходимые физические характеристики; методики де- и рецеллюляризации, разработанные в настоящем исследовании, позволяют надеяться на возможность их успешного использования в клинической практике. Но для этого необходимы доклинические исследования на крупных лабораторных животных, например на свиньях, с оценкой отдаленных результатов состояния стенки сосуда, его проходимость через 1 год после имплантации и более. При таком подходе, в отличие от экспериментов на мелких лабораторных животных, становится возможным использование аутологичных клеток, отсутствует необходимость искусственно уменьшать диаметр ТИКС перед имплантацией, появляется возможность использования более длинных шунтов, что максимально приближается к реальным условиям.

Таким образом, полученные в ходе диссертационной работы результаты позволяют создать новые малого калибра кровеносные сосуды, которые по своим достоинствам приближаются к естественным и значительно превосходят искусственные.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Быстрое развитие сердечно-сосудистой хирургии выявило очевидный в настоящее время дефицит сосудистых кондуитов малого диаметра. Последние необходимы для таких распространенных операций как аорто-коронарное шунтирование, реваскуляризация артерий нижних конечностей, создание артериовенозных фистул для гемодиализа и других. Используемые в настоящее время венозные аутотрансплантаты не редко дефицитны или не годны для применения. Синтетические протезы с успехом применяются при шунтировании сосудов с диаметром более 6 мм, но при меньшем размере они быстро тромбируются. Все это стимулирует развитие в последнее десятилетие тканевой инженерии кровеносных сосудов. «Искусственные» артерии или вены должны отвечать всем требованиям, предъявляемым в настоящее время к сосудистым заменителям.

Целью исследования была разработка способа создания кровеносного сосуда малого калибра со свойствами нативной артерии с помощью методов тканевой инженерии.

Для достижения поставленной цели была использована классическая концепция тканевой инженерии, согласно которой клетки реципиента помещают и выращивают на трехмерном каркасе, имеющего вид полой трубки.

Соответственно, основными задачами исследования, которые разделили работу на 3 основных этапа, были:

1) создание основы будущего сосуда;

2) заселение полученной основы нужными клетками;

3) оценка проходимости и структурных изменений тканеинженерных кровеносных сосудов в эксперименте.

Для создания основы будущего сосуда нами использован метод децеллюляризации донорской артерии. Под этим понимают удаление клеток и клеточного дебриса из сосудистой стенки с оставлением только внеклеточного матрикса. Последний состоит в основном из структурных белков, отвечающих за прочность сосуда, и лишен иммуногенных свойств.

В качестве субстрата нами выбраны артерии пуповины человека. На наш взгляд, они имеют ряд достоинств, что делает их использование очень перспективным. Прежде всего, пуповина легко доступна и её получение не вызывает этических проблем, так как чаще всего она утилизируется. Длина пуповины достигает 40-60 см, и, соответственно, обе артерии проходящие в ней, могут быть легко выделены на протяжении 30-50 см. Артерии пуповины не имеют боковых ветвей, их диаметр одинаков на всем протяжении и при физиологическом давлении составляет приблизительно 4 мм, что и требуется для шунтов, часто используемых в клинических ситуациях, например, при аорто-коронарном или бедренно-подколенном

шунтировании.

В настоящей работе для децеллюляризации артерий пуповины исследованы 6 различных методов, описанных в литературе. Ни один из них не дал удовлетворительного результата, что привело к разработке собственной методики, на которую был получен патент РФ на изобретение №2504334. Всего в ходе работы было децеллюляризовано более 200 участков артерий пуповины длиной 5 см, поставлено более 260 различных опытов, изготовлено и изучено более 450 гистологических препаратов.

Для оценки эффективности децеллюляризации были проведены гистологические исследования, а именно окраска гематоксилином и эозином, по Ван Гизону с эластикой, иммуногистохимический анализ с антителами к CD31 и α-гладкомышечному актину, оценивалось количество и качество ДНК и РНК. На гистологических препаратах децеллюляризованных артерий, окрашенных гематоксилином и эозином, и по Ван-Гизону с эластикой клетки не обнаружены, а внеклеточный матрикс сосуда выглядел неизмененным.

Отсутствие ИГХ реакции к антигену CD31, характерному для эндотелиоцитов, и к альфа-гладкомышечному актину, характерному для миоцитов, косвенно подтверждает не только лизис этих клеток, но и удаление клеточного дебриса из всей толщи сосудистой стенки.

Кроме того, для визуального определения нуклеиновых кислот использовали окраску DAPI, которая была негативной после децеллюляризации. Отсутствие ДНК и РНК подтверждено также спектрофотометрическим методом.

Поскольку прочность будущего тканеинженерного сосуда напрямую зависит от механических характеристик носителя клеток, эти свойства артерий пуповины после децеллюляризации и были впервые в литературе изучены. Определено максимальное выдерживаемое сосудами давление, их упруго-эластические свойства в продольном и поперечном направлениях и устойчивость к прорезыванию шовным материалом.

Кроме того, исследованы механические свойства децеллюляризованных артерий после длительно хранения либо в охлажденном фосфатно-солевом буферном растворе, либо хранимых в замороженном состоянии. Снижение прочности сосудов после размораживания заставило нас отказаться от методики криоконсервирования. В остальных опытах межгрупповые различия оказались статистически не значимы. Таким образом, был сделан вывод, что механические свойства артерий пуповины сохраняются после децеллюляризации, в том числе после длительного, не менее 10 месяцев, хранения.

Следующий этап – рецеллюляризация, т.е. заселение внеклеточного матрикса клетками. В ходе выполнения работы использованы мезенхимные стволовые клетки костного мозга и жировой ткани крысы, различий между использованием клеток этих двух типов не обнаружено.

Засев клеток на матрикс осуществляли введением клеточной суспензии в просвет сосуда.

Её объем был постоянен и равнялся 100 мкл. Эмпирическим путем было подобрано лучшее количество клеток, которое составило $1x10^6$.

В результате 44 экспериментов по повышению эффективности рецеллюляризации сосудистых кондуитов мы использовали комбинацию статического метода доставки клеток с последующей перфузией сосудистого кондуита в биореакторе. В итоге нам удалось улучшить результаты статичного заселения клеток, повысить их жизнеспособность, сократить продолжительность культивирования до 5 суток, достигая образования нескольких слоев клеток по всей внутренней поверхности графта и инфильтрации их вглубь сосудистой стенки. В конце процедуры перфузии сосудистого кондуита в биореакторе мы получили прекондиционированный тканеинженерный кровеносный сосуд, готовый к трансплантации в артериальную позицию лабораторного животного, где исследовали дальнейшую его перестройка в «зрелый» кровеносный сосуд.

Эксперименты проведены на самцах крыс породы Вистар. Всего 25 опытов: 5 животным имплантировали аорту другой крысы, 10 - децеллюляризованную артерию пуповины, незасеянную клетками и еще 10 имплантировали тканеинженерный кровеносный сосуд. Несмотря на то, что использованы аллогенные мезенхимные клетки крысы, следует признать их близкими к аутологичным в связи с использованием в эксперименте инбредных крыс, которые генетически схожи между собой. Для отслеживания стволовых клеток, они предварительно были мечены прижизненным флюоресцентным красителем PKH26.

В связи с очевидной разницей диаметра нормальной аорты крысы, которая составляет около 1 мм и артерий пуповины, чей диаметр около 4 мм, последние перед имплантацией «ушивали» до необходимого размера. Отмечено удобство работы с сосудом, легкость наложения шва. Сразу после операции все сосудистые кондуиты были проходимы. В послеоперацинном периоде антикоагулянты и дезагреганты не назначали. Крыс выводили из эксперимента на 30-е сутки после операции или раньше, если были клинические проявления тромбоза шунта.

В контрольной группе все имплантированные сосуды оставались проходимыми, несмотря на их аллогенное происхождение.

В группе «незасеянных клетками сосудистых кондуитов» одна крыса исключена из исследования в связи с нагноением послеоперационной раны и в анализе проходимости не учитывалась. У 7 из 9 оставшихся животных этой группы сосудистые кондуиты тромбировались в различные сроки в течение месяца после имплантации, и только у двух были проходимы.

В группе тканеинженерных графтов одну крысу без признаков тромбоза вывели из эксперимента на 2-е сут. после операции для оценки динамики клеточного состава сосудистой стенки в раннем послеоперационном периоде. Это животное не учитывали при расчёте степени

проходимости изучаемых сосудов. Остальные 9 крыс оставались живы до 30 сут. после операции, парапарезов не было. За этот период тромбировался только 1 из 9 имплантированных графтов.

Таким образом, тканеинженерные сосуды, предварительно засеянные мезенхимными стволовыми клетками, показали значительно более высокий уровень проходимости по сравнению с незасеянными сосудистыми кондуитами.

При эксплантации графтов не было выявлено их аневризматечкого расширения. Макроскопически отмечено образование негрубой рубцовой ткани в зоне операции во всех трех группах опытов. При морфологическом исследовании отмечена богатая инфильтрация стенки графтов клетками.

В просвете 7 эксплантатов, которые не были предварительно засеяны клетками (группа 2), отмечено наличие окклюзирующего тромба, в большинстве случаев сочетающееся с гиперплазией сосудистой стенки и сужением просвета. Остальные 2 из 9 сосудистых кондуитов этой группы, были проходимы, но при гистологическом исследовании также отмечена выраженная гиперплазия стенки графтов.

В группе тканеинженерных графтов (группа 3) клетки организма-реципиента инфильтрировали стенку сосуда с наружной стороны, формируя ткань, напоминающую адвентицию и средний слой нормальной артерии.

Клетки, выстилающие внутреннюю поверхность ТИКС, имели положительную ИГХ-окраску на антиген, характерный для эндотелиоцитов. Клетки хозяина, привлеченные в стенку сосудистого кондуита в большом количестве окрашивались при ИГХ-реакции на альфа-гладкомышечный актин, что позволяет препдолоджить, что это - миофибробласты. Таким образом, структура засеянных графтов через месяц после имплантации изменилась и напоминала строение нативной артерии

Представляется, что МСК, предварительно засеянные на матрикс до операции, играли ключевую роль в обеспечении проходимости графтов. В тканеинженерном сосуде через 2 суток после имплантации продолжали визуализироваться меченые аллогенные стволовые клетки, хотя и в меньшем количестве. В образцах, эксплантированных через 30 сут. после операции, меченых клеток не обнаружено. Вероятно, что стволовые аллогенные клетки обеспечивают лишь кратковременную атромбогенность сосудов, постепенно замещаясь клетками реципиента.

Таким образом, результаты данного диссертационного исследования показывают, что создание искусственных сосудов с заданными биологическими и механическими свойствами – выполнимо. ТИКС на основе ДАП, заселённых мезенхимными стволовыми клетками реципиента, пригодны для решения как экспериментальных задач, так, возможно, и для реконструктивной сердечно-сосудистой хирургии. Дальнейшие исследования могут быть

направлены на трансляцию методов тканевой инженерии кровеносных сосудов в клиническую практику.

* * *

Благодарности

Хочу выразить огромную благодарность моим научным руководителям Вавилову Валерию Николаевичу и Анисимову Сергею Владимировичу за помощь и наставления в выполнении данной работы.

С удовольствием хочу также поблагодарить Митрофанову Любовь Борисовну и других сотрудников патоморфологической лаборатории ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» за помощь и консультации при проведении морфологических исследований.

Отдельное спасибо Лебедевой Елене Александровне, доценту кафедры прикладной механики и инженерной графики Санкт-Петербургского государственного электротехнического университета «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина) за предоставленную возможность проведения механических испытаний.

Выражаю признательность Курапееву Дмитрию Ильичу, Галагудзе Михаилу Михайловичу, Пузанову Максиму Викторовичу и Лаврешину Алексею Владимировичу за теоретическую и практическую поддержку при проведении исследований на различных этапах работы.

Часть работы (а именно разработка способа децеллюляризации) выполнена при поддержке гранта Министерства образования и науки Российской Федерации (Соглашение № 8161).

ВЫВОДЫ

1. Разработан эффективный способ децеллюляризации артерий пуповины. При этом механические свойства нативных артерий после децеллюляризации сохраняются. В децеллюляризованных артериях клетки и клеточный дебрис не определяется, внеклеточный матрикс артерии остается интактным.
2. Механические свойства децеллюляризованных артерий пуповины не меняются при их длительном хранении.
3. МСК фиксируются на стенке децеллюляризованных артерий пуповины и сохраняют свою жизнеспособность. Определена оптимальная плотность и методика посева МСК на децеллюляризованные артерии пуповины. Разработан оригинальный проточный биореактор, использование которого улучшает результаты рецеллюляризации артерий пуповины, лишенных клеточного состава.
4. Через 30 сут. наблюдения проходимость децеллюляризованных артерий пуповины, засеянных МСК, значительно выше чем незасеянных.
5. Полученные в ходе диссертационной работы результаты позволяют перейти к доклиническому исследованию полученных тканеинженерных кровеносных сосудов.
6. Рецеллюляризированные артерии пуповины показали высокую проходимость в эксперименте.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При оценке свойств новых видов децеллюляризированных сосудов предлагаем использовать тот же объем проведённого нами комплексного изучения полноты удаления клеток и клеточного дебриса из донорской ткани с обязательным определением механических характеристик.
2. Артерии пуповины подходят для изготовления тканеинженерных кровеносных сосудов диаметром 3-4 мм и длиной до 50 см. Мы рекомендуем использовать предлагаемую методику децеллюляризации для получения неиммуногенного внеклеточного матрикса сосудов с сохраненными механическими параметрами.
3. Децеллюляризированные артерии пуповины следует хранить в охлажденном фосфатно-солевом буферном растворе.
4. Перед имплантацией засеянных графтов необходимо проводить их прекультивирование в биореакторе, обеспечивающим постоянный ток питательный среды через просвет сосуда.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ахмедов, Ш. Д. Использование бесклеточного матрикса для формирования новых кровеносных сосудов и сердца методом тканевой инженерии / Ш. Д. Ахмедов, С. А. Афанасьев, М. Л. Дьякова, Т. Х. Фатхутдинов, Л. В. Кактурский // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2009. – Т. IV. - № 2. – С. 32-39.
2. Бландова, З. К. Правила разведения инбредных лабораторных животных : методическое указание / З. К. Бландова, А. М. Малашенко, В. П. Крышкина, Х. Х. Семенов, Е. Ф. Шмидт. - М.: Издательство АМН СССР, 1979. - 17 с.
3. Бокерия, Л.А. К вопросу о планировании научных исследований (обзор литературы) / Л.А. Бокерия, Л.Л. Стрижакова, Т.И. Юшкевич // Бюллетень НЦССХ им. А.Н.Бакулева РАМН. – 2004. – Т. 5. - № 10. – С. 46-61.
4. Волова, Т. Г. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии : учеб. пособие / Т. Г. Волова. – Красноярск: ИПК СФУ, 2009. - 262 с.
5. Гасанов, А.Ф.о. Экспериментальное обоснование и клиническое использование артерии и вены пуповины новорожденного в качестве сосудистого шунта для хирургического лечения ИБС : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.00.44 / Гасанов Анар Физули оглы. – М., 2008. – 24 с.
6. Гмурман В. Е. Теория вероятностей и математическая статистика : учеб. пособие для ВУЗов / В.Е. Гмурман. – 9-е изд., стер. – М.: «Высш. шк.», 2003. - 479 с.
7. Гордеев, М.Л. Пути оптимизации операций прямой реваскуляризации миокарда у больных высокой степени риска : дис. ... докт. мед. наук. спец. : 14.00.44 / Гордеев Михаил Леонидович. – СПб., 2001. - 221 с.
8. Егорова, М.В. Экономичная технология получения бесклеточной матрицы артериального сосуда животных и человека / М.В. Егорова, Ю.В. Роговская, А.В. Иванов, С.Л. Андреев, Ш.Д. Ахмедов, С.А. Афанасьев // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2011. – №2. – С. 110-113.
9. Карпенко, М.А. Итоги клинической работы Центра в 2013 году / М.А. Карпенко, И.Г. Стрижак // Трансляционная медицина. – 2014. - Приложение «Итоги работы Федерального исследовательского центра им. В.А.Алмазова за 2013 год». – С.105-136.
10. Курьянов, П. С. Механизмы гиперплазии интимы и её значение при хирургическом лечении атеросклероза сонных артерий : дис. ... канд. мед. наук : 14.00.44 / Курьянов Павел Сергеевич. – СПб., 2009. - 125 с.
11. Лебедев, Л.В. Протезы кровеносных сосудов.4-е изд., переработонное и дополненное / Л.В. Лебедев, Л.Л. Плоткин, А.Д. Смирнов, В.Н. Вавилов, Ю.В. Лукьянов, Г.Н. Горбунов. – СПб:

«Издательский дом “Адмиралтейство”», 2001. – 296 с.

12. Лукьянов, Ю.В. Применение вены пуповины человека для пластики артерий (экспериментальное исследование) : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.00.44 / Лукьянов Юрий Владимирович. - Л., 1981. – 16 с.
13. Макарова, Н.В.Статистика в Excel : учеб. пособие / Н.В. Макарова, В.Я. Трофимец. - М.: Финансы и статистика, 2002. - 368 с.
14. Acland, R.D. Signs of patency in small vessel anastomosis / R.D. Acland // Surgery. – 1972. – Vol. 72. - № 5. – P. 744-748.
15. Aggarwal, S. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses / S. Aggarwal, M. F. Pittenger // Blood. - 2005. – Vol. 105. – № 4. – P. 1815–1822.
16. Ahsan, T. Bioengineered tissues: the science, the technology, and the industry / T. Ahsan, R. M. Nerem // Orthod. Craniofac. Res. – 2005. – Vol. 8. – № 3. – P. 134–140.
17. Amiel, G.E. Engineering of blood vessels from acellular collagen matrices coated with human endothelial cells / G.E. Amiel, M. Komura, O. Shapira, J.J. Yoo, S. Yazdani, J. Berry, S. Kaushal, J. Bischoff, A. Atala, S. Soker // Tissue Eng. – 2006. – Vol. 12 – № 8. – P. 2355-2365.
18. Athanasiou, T. Radial artery versus saphenous vein conduits for coronary artery bypass surgery: forty years of competition — which conduit offers better patency? A systematic review and meta-analysis. Review Article / T. Athanasiou, S. Saso, C. Rao, J. Vecht, J. Grapsa, J. Dunning, M. Lemma, R. Casula // Eur. J. of Cardio-Thoracic Surg. – 2011. – Vol. 40. - № 1. – P. 208-220.
19. Bačáková, L. Polysaccharides as cell carriers for tissue engineering: the use of cellulose in vascular wall reconstruction / L. Bačáková, K. Novotná, M. Pařízek // Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov. – 2014. – Vol. 63 Suppl 1. – P. S29–47.
20. Baguneid, M.S. Tissue engineering of blood vessels / M. S. Baguneid, A. M. Seifalian, H. J. Salacinski, D. Murray, G. Hamilton, M. G. Walker // Br. J. Surg. – 2006. – Vol. 93 – № 3. – P. 282–290.
21. Bajpai, V.K. Stem Cell Sources for Vascular Tissue Engineering and Regeneration / V. K. Bajpai, S. T. Andreadis // Tissue Eng. Part B Rev. – 2012. – Vol. 18. – № 5. – P. 405–425.
22. Berglund, J.D. A biological hybrid model for collagen-based tissue engineered vascular constructs / J. D. Berglund, M. M. Mohseni, R. M. Nerem, A. Sambanis // Biomaterials. – 2003. – Vol. 24. – № 7. – P. 1241–1254.
23. Blum, J.S. Development and characterization of enhanced green fluorescent protein and luciferase expressing cell line for non-destructive evaluation of tissue engineering constructs / J. S. Blum, J. S. Temenoff, H. Park, J. A. Jansen, A. G. Mikos, M. A. Barry // Biomaterials. – 2004. – Vol. 25. – № 27. – P. 5809–5819.
24. Boccafoschi, F. Biological performances of collagen-based scaffolds for vascular tissue

engineering / F. Boccafoschi, J. Habermehl, S. Vesentini, D. Mantovani // Biomaterials – 2005. – Vol. 26. – № 35. – P. 7410–7417.

25. Bowlin, G.L. The persistence of electrostatically seeded endothelial cells lining a small diameter expanded polytetrafluoroethylene vascular graft / G. L. Bowlin, A. Meyer, C. Fields, A. Cassano, R. G. Makhoul, C. Allen, S. E. Rittgers // J. Biomater. Appl. – 2001. – Vol. 16. – № 2. – P. 157–173.
26. Campbell, G.R. Development of Tissue Engineered Vascular Grafts / G. R. Campbell, J. H. Campbell // Curr. Pharm. Biotechnol. – 2007. – Vol. 8. – № 1. – P. 43–50.
27. Campbell, J.H. Haemopoietic origin of myofibroblasts formed in the peritoneal cavity in response to a foreign body / J.H. Campbell, J.L. Efendy, C.-L. Han, A. A. Girjes, G. R. Campbell // J. Vasc. Res. – 2000. – Vol. 37. – № 5. – P. 364–371.
28. Campbell, J.H. Novel vascular graft grown within recipient's own peritoneal cavity / J.H. Campbell, J.L. Efendy, G.R. Campbell // Circ. Res. – 1999. – Vol.85. – № 12. – P.1173– 1178.
29. Cebotari, S. Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells / S. Cebotari, I. Tudorache, T. Jaekel, A. Hilfiker, S. Dorfman, W. Ternes, A. Haverich, A. Lichtenberg // Artif. Organs – 2010. – Vol. 34 – № 3. – P. 206–210.
30. Chang, Y. Cell-free xenogenic vascular grafts fixed with glutaraldehyde or genipin: in vitro and in vivo studies / Y. Chang, C.-K. Hsu, H.-J. Wei, S.-C. Chen, H.-C. Liang, P.-H. Lai, H.-W. Sung // J. Biotechnol. – 2005. – Vol. 120 – № 2. – P. 207–219.
31. Chen, Q.-Z. Biomaterials in cardiac tissue engineering: Ten years of research survey / Q.-Z. Chen, S. E. Harding, N. N. Ali, A. R. Lyon, A. R. Boccaccini // Mater. Sci. Eng.: R: Rep. – 2008. – Vol. 59. – № 1–6. – P. 1–37.
32. Chester, A.H. The living aortic valve: From molecules to function / A.H. Chester, I. El-Hamamsy, J.T. Butcher, N. Latif, S. Bertazzo, M.H. Yacoub // Global Cardiology Science and Practice. - 2014. – Vol. 11. – P. 52-77.
33. Cho, S.-W. Small-diameter blood vessels engineered with bone marrow-derived cells / S.-W. Cho, S. H. Lim, I.-K. Kim, Y. S. Hong, S.-S. Kim, K. J. Yoo, H.-Y. Park, Y. Jang, B. C. Chang, C. Y. Choi, K.-C. Hwang, B.-S. Kim // Ann. Surg. – 2005. – Vol. 241. – № 3. – P. 506–515.
34. Chue, W.L. Dog peritoneal and pleural cavities as bioreactors to grow autologous vascular grafts / W.L. Chue, G. R. Campbell, N. Caplice, A. Muhammed, C. L. Berry, A.C. Thomas, M. B. Bennett, J. H. Campbell // J. Vasc. Surg. – 2004. - Vol. 39. - № 4. – P. 859-867.
35. Conte, M.S. The ideal small arterial substitute: a search for the Holy Grail? / M. S. Conte // FASEB J. – 1998. – Vol. 12. – № 1. – P. 43–45.
36. Crapo, P.M. An overview of tissue and whole organ decellularization processes / P. M. Crapo, T.

W. Gilbert, S. F. Badylak // Biomaterials. – 2011. – Vol. 32. – № 12. – P. 3233–3243.

37. Dahl, S.L.M. Decellularized native and engineered arterial scaffolds for transplantation / S. L. M. Dahl, J. Koh, V. Prabhakar, L. E. Niklason // Cell Transplant. – 2003. – Vol. 12. – № 6. – P. 659–666.
38. Dahl, S.L.M. Readily available tissue-engineered vascular grafts / S. L. M. Dahl, A. P. Kypson, J. H. Lawson, J. L. Blum, J. T. Strader, Y. Li, R. J. Manson, W. E. Tente, L. DiBernardo, M. T. Hensley, R. Carter, T. P. Williams, H. L. Prichard, M. S. Dey, K. G. Begelman, L. E. Niklason // Sci. Transl. Med. – 2011. – Vol. 3. – № 68 (68ra9). – P. 1-11.
39. Daniel, J. Development of the human umbilical vein scaffold for cardiovascular tissue engineering applications / J. Daniel, K. Abe, P. S. McFetridge // ASAIO J. - 2005. – Vol. 51. – № 3. – P. 252–261.
40. Dardik, H. Successful arterial substitution with modified human umbilical vein / H. Dardik, I. I. Dardik // Ann. Surg. – 1976. – Vol. 183 – № 3. – P. 252–258.
41. Dardik, H. Evaluation of glutaraldehyde-tanned human umbilical cord vein as a vascular prosthesis for bypass to the popliteal, tibial, and peroneal arteries / H. Dardik, I. M. Ibrahim, I. Dardik // Surgery. – 1978. – Vol. 83 – № 5. – P. 577–588.
42. Dardik, H. Biodegradation and aneurysm formation in umbilical vein grafts. Observations and a realistic strategy / H. Dardik, I. M. Ibrahim, B. Sussman, M. Kahn, M. Sanchez, S. Klausner, R. E. Baier, A. E. Meyer, I. I. Dardik // Ann. Surg. – 1984. – Vol. 199 – № 1. – P. 61–68.
43. Dardik, H. A decade of experience with the glutaraldehyde-tanned human umbilical cord vein graft for revascularization of the lower limb / H. Dardik, N. Miller, A. Dardik, I. Ibrahim, B. Sussman, S. M. Berry, F. Wolodiger, M. Kahn, I. Dardik // J. Vasc. Surg. – 1988. – Vol. 7. – № 2 – P. 336–346.
44. Det, R.J. van Dacron or ePTFE for femoro-popliteal above-knee bypass grafting: short- and long-term results of a multicentre randomised trial / R. J. van Det, B. H. R. Vriens, J. van der Palen, R. H. Geelkerken // Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. – 2009. – Vol. 37 – № 4. – P. 457–463.
45. Dmitrieva, R.I. Bone marrow- and subcutaneous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: differences and similarities / R. I. Dmitrieva, I. R. Minullina, A. A. Bilibina, O. V. Tarasova, S. V. Anisimov, A. Y. Zaritskey // Cell Cycle Georget. Tex. – 2012. – Vol. 11 – № 2. – P. 377–383.
46. Dobrin, P.B. Mechanical properties of arterises / P. B. Dobrin // Physiol. Rev. – 1978. – Vol. 58 – № 2. – P. 397–460.
47. Dong, J.-D. Mesenchymal stem cell-based tissue engineering of small-diameter blood vessels / J.-D. Dong, J.-H. Huang, F. Gao, Z.-H. Zhu, J. Zhang // Vascular. – 2011. – Vol. 19 – № 4. – P. 206–213.
48. Drumheller, P.D. Polymer Networks with Grafted Cell Adhesion Peptides for Highly Biospecific

Cell Adhesive Substrates / P. D. Drumheller, J. A. Hubbell // Anal. Biochem. – 1994. – Vol. 222. – № 2. – P. 380–388.

49. Erdbrügger, W. Decellularized Xenogenic Heart Valves Reveal Remodeling and Growth Potential *in Vivo* / W. Erdbrügger, W. Konertz, P. M. Dohmen, S. Posner, H. Ellerbrok, O.-E. Brodde, H. Robenek, D. Modersohn, A. Pruss, S. Holinski, M. Stein-Konertz, G. Pauli // Tissue Eng. – 2006. – Vol. 12. – № 8. – P. 2059–2068.
50. Fields, C. Endothelial cell seeding of a 4-mm I.D. polyurethane vascular graft / C. Fields, A. Cassano, C. Allen, A. Meyer, K. J. Pawlowski, G. L. Bowlin, S. E. Rittgers, M. Szycher // J. Biomater. Appl. – 2002. – Vol. 17. – № 1. – P. 45–70.
51. Fields, C. Evaluation of electrostatically endothelial cell seeded expanded polytetrafluoroethylene grafts in a canine femoral artery model / C. Fields, A. Cassano, R. G. Makhoul, C. Allen, R. Sims, J. Bulgrin, A. Meyer, G. L. Bowlin, S. E. Rittgers // J. Biomater. Appl. – 2002. – Vol. 17. – № 2. – P. 135–152.
52. Fitzpatrick, J.C. Effect of Decellularization Protocol on the Mechanical Behavior of Porcine Descending Aorta / J. C. Fitzpatrick, P. M. Clark, F. M. Capaldi // Int. J. Biomater. – 2010. – Vol. 2010. – P. 1-11.
53. Fung, Y. C.Biomechanics: Mechanical Properties of Living Tissues / Y. C. Fung. – 2nd ed. – New York : Springer-Verlag, 1993. - 568p.
54. Geeslin, M.G. Bioreactor for the reconstitution of a decellularized vascular matrix of biological origin / M. G. Geeslin, G. J. Caron, S. M. Kren, E. M. Sparrow, D. A. Hultman, D. A. Taylor // J. Biomedical Science and Engineering. - 2011. – Vol. 4. – P. 435-442.
55. Gilbert, T.W. Decellularization of tissues and organs / T. W. Gilbert, T. L. Sellaro, S. F. Badylak // Biomaterials – 2006. – Vol. 27. – № 19. – P. 3675–3683.
56. Godbey, W.T. A novel use of centrifugal force for cell seeding into porous scaffolds / W. T. Godbey, S. B. S. Hindy, M. E. Sherman, A. Atala // Biomaterials. – 2004. – Vol. 25. – № 14. – P. 2799–2805.
57. Gonzalez-Molina, J. Rapid magnetic cell delivery for large tubular bioengineered constructs / J. Gonzalez-Molina, J. Riegler, P. Southern, D. Ortega, C. C. Frangos, Y. Angelopoulos, S. Husain, M. F. Lythgoe, Q. A. Pankhurst, R. M. Day // J. R. Soc. Interface. – 2012. – Vol. 9. – № 76. – P. 3008–3016.
58. Gui, L. Development of decellularized human umbilical arteries as small-diameter vascular grafts / L. Gui, A. Muto, S. A. Chan, C. K. Breuer, L. E. Niklason // Tissue Eng. Part A – 2009. – Vol. 15. – № 9. – P. 2665–2676.
59. Hashi, C.K. Antithrombogenic property of bone marrow mesenchymal stem cells in nanofibrous vascular grafts / C. K. Hashi, Y. Zhu, G.-Y. Yang, W. L. Young, B. S. Hsiao, K. Wang, B. Chu, S.

Li // PNAS USA. – 2007. – Vol. 104. – № 29. – P. 11915–11920.

60. Hass, R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC / R. Hass, C. Kasper, S. Bohm, R. Jacobs // Cell Commun. Signal. CCS. – 2011. – Vol. 9. – P. 1-14.
61. He, W. Pericyte-Based Human Tissue Engineered Vascular Grafts / W. He, A. Nieponice, L. Soletti, Y. Hong, B. Gharaibeh, M. Crisan, A. Usas, B. Peault, J. Huard, W. R. Wagner, D. A. Vorp // Biomaterials. – 2010. – Vol. 31. - № 32. – P. 8235–8244.
62. Herring, M. A single-staged technique for seeding vascular grafts with autogenous endothelium / M. Herring, A. Gardner, J. Glover // Surgery. – 1978. – Vol. 84. – № 4. – 498–504.
63. Herring, M.B. Seeding arterial prostheses with vascular endothelium. The nature of the lining / M. B. Herring, R. Dilley, R. A. Jersild Jr, L. Boxer, A. Gardner, J. Glover // Ann. Surg. – 1979. – Vol. 190. – № 1. – P. 84–90.
64. Hirai, J. Highly Oriented, Tubular Hybrid Vascular Tissue for a Low Pressure Circulatory System / J. Hirai, K. Kanda, T. Matsuda, T. Oka. – 1994. – Vol. 40. – № 3. – P. 383–388.
65. Hirai, J. Venous reconstruction using hybrid vascular tissue composed of vascular cells and collagen: Tissue regeneration process / J. Hirai, T. Matsuda // Cell Transplant. – 1996. – Vol. 5. – № 1. – P. 93–105.
66. Hoenicka, M. Advantages of human umbilical vein scaffolds derived from cesarean section vs. vaginal delivery for vascular tissue engineering / M. Hoenicka, V. R. Jacobs, G. Huber, F.-X. Schmid, D. E. Birnbaum // Biomaterials. – 2008. – Vol. 29. – № 8. – P. 1075–1084.
67. Hoerstrup, S.P. Tissue engineering of small caliber vascular grafts / S. P. Hoerstrup, G. Zünd, R. Sodian, A. M. Schnell, J. Grünenfelder, M. I. Turina // Eur. J. Cardiothorac. Surg. – 2001. – Vol. 20. – № 1. – P. 164–169.
68. Hoerstrup, S.P. Living, autologous pulmonary artery conduits tissue engineered from human umbilical cord cells / S. P. Hoerstrup, A. Kadner, C. Breymann, C. F. Maurus, C. I. Guenter, R. Sodian, J. F. Visjager, G. Zund, M. I. Turina // Ann. Thorac. Surg. – 2002. – Vol. 74. – № 1. – P. 46–52.
69. Howard, D. Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds / D. Howard, L. D. Buttery, K. M. Shakesheff, S. J. Roberts // J. Anat. – 2008. – Vol. 213. – № 1. – P. 66–72.
70. Hsu, S. The effect of dynamic culture conditions on endothelial cell seeding and retention on small diameter polyurethane vascular grafts / S. Hsu, I. Tsai, D. Lin, D. C. Chen // Med. Eng. Phys. – 2005. – Vol. 27. – № 3. – P. 267–272.
71. Ingavle, G.C. Advancements in Electrospinning of Polymeric Nanofibrous Scaffolds for Tissue Engineering / G. C. Ingavle, J. K. Leach // Tissue Eng. Part B Rev. – 2013. – Vol. 20. – № 4. – P. 277–93.

72. Ito, A. Novel Methodology for Fabrication of Tissue-Engineered Tubular Constructs Using Magnetite Nanoparticles and Magnetic Force / A. Ito, K. Ino, M. Hayashida, T. Kobayashi, H. Matsunuma, H. Kagami, M. Ueda, H. Honda // Tissue Eng. – 2005. – Vol. 11. – № 9-10. – P. 1553–1561.
73. Kakisis, J.D. Artificial blood vessel: the Holy Grail of peripheral vascular surgery / J. D. Kakisis, C. D. Liapis, C. Breuer, B. E. Sumpio // J. Vasc. Surg. – 2005. – Vol. 41. – № 2. – P. 349–354.
74. Kalra, M. Early remodeling of saphenous vein grafts: proliferation, migration and apoptosis of adventitial and medial cells occur simultaneously with changes in graft diameter and blood flow / M. Kalra, V. M. Miller // J. Vasc. Res. – 2000. – Vol. 37. – № 6. – P. 576–584.
75. Kanda, K. In vitro reconstruction of hybrid vascular tissue. Hierarchic and oriented cell layers / K. Kanda, T. Matsuda, T. Oka // ASAIO J. – 1993. – Vol. 39. – № 3. – P. M561–M565.
76. Kanda, K. In vitro reconstruction of hybrid arterial media with molecular and cellular orientations // K. Kanda, T. Matsuda // Cell Transplant. – 1994. – Vol. 3. – № 6. – P. 537–545
77. Kempczinski, R.F. Endothelial cell seeding of a new PTFE vascular prosthesis / R. F. Kempczinski, J. E. Rosenman, W. H. Pearce, L. R. Roedersheimer, Y. Berlatzky, G. Ramalanjaona // J. Vasc. Surg. – 1985. – Vol. 2. – № 3. – P. 424–429.
78. Kim, B.-S. Optimizing seeding and culture methods to engineer smooth muscle tissue on biodegradable polymer matrices / B.-S. Kim, A. J. Putnam, T. J. Kulik, D. J. Mooney // Biotechnol. Bioeng. – 1998. – Vol. 57. – № 1. – P. 46–54.
79. Kim, B.-S. Engineered Smooth Muscle Tissues: Regulating Cell Phenotype with the Scaffold / B.-S. Kim, J. Nikolovski, J. Bonadio, E. Smiley, D. J. Mooney // Exp. Cell Res. – 1999. – Vol. 251. – № 2. – P. 318–328.
80. Kim, B.-S. Design of artificial extracellular matrices for tissue engineering / B.-S. Kim, I.-K. Park, T. Hoshiba, H.-L. Jiang, Y.-J. Choi, T. Akaike, C.-S. Cho // Prog. Polym. Sci. – 2011. – Vol. 36. – № 2. – P. 238–268.
81. Klinkert, P. Saphenous vein versus PTFE for above-knee femoropopliteal bypass. A review of the literature / P. Klinkert, P. N. Post, P. J. Breslau, J. H. van Bockel // Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. – 2004. – Vol. 27. – № 4. – P. 357–362.
82. Krawiec, J.T. Adult stem cell-based tissue engineered blood vessels: A review / J. T. Krawiec, D. A. Vorp // Biomaterials. – 2012. – Vol. 33. – № 12. – P. 3388–3400.
83. L’Heureux, N. In vitro construction of a human blood vessel from cultured vascular cells: A morphologic study / N. L’Heureux, L. Germain, R. Labbé, F. A. Auger // J. Vasc. Surg. – 1993. – Vol. 17. – № 3. – P. 499–509.
84. L’Heureux, N. A completely biological tissue-engineered human blood vessel / N. L’Heureux, S. Pâquet, R. Labbé, L. Germain, F. A. Auger // FASEB J. – 1998. – Vol. 12. – № 1. – P. 47–56.

85. L'Heureux, N. Technology insight: the evolution of tissue-engineered vascular grafts--from research to clinical practice / N. L'Heureux, N. Dusserre, A. Marini, S. Garrido, L. de la Fuente, T. McAllister // Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med. – 2007. – Vol. 4. – № 7. – P. 389–395.
86. L'Heureux, N. Tissue-engineered blood vessel for adult arterial revascularization / N. L'Heureux, T. N. McAllister, L. M. de la Fuente // N. Engl. J. Med. – 2007. – Vol. 357. – № 14. – P. 1451–1453.
87. Liao, J. Effects of decellularization on the mechanical and structural properties of the porcine aortic valve leaflet / J. Liao, E. M. Joyce, M. S. Sacks // Biomaterials. – 2008. – Vol. 29. – № 8. – P. 1065–1074.
88. Liu, G.-F. Decellularized aorta of fetal pigs as a potential scaffold for small diameter tissue engineered vascular graft / G.-F. Liu, Z.-J. He, D.-P. Yang, X.-F. Han, T.-F. Guo, C.-G. Hao, H. Ma, C.-L. Nie // Chin. Med. J. (Engl.) – 2008. – Vol. 121. – № 15. – P. 1398–1406.
89. Lopez-Soler, R.I. Development of a mouse model for evaluation of small diameter vascular grafts / R.I. Lopez-Soler, M.P. Brennan, A. Goyal, Y. Wang, P. Fong, G. Tellides, A. Sinusas, A. Dardik, C. Breuer // J Surg Res. – 2007. – Vol. 139. - № 1. – P.1–6.
90. Lyons, E. Design of Bioreactors for Cardiovascular Applications / E. Lyons, A. Pandit. In: Topics in Tissue Engineering. Vol. 2. - University of Oulu, Finland, 2005. - P. 1-32.
91. Ma, H. Polymer scaffolds for small-diameter vascular tissue engineering / H. Ma, J. Hu, P. X. Ma // Adv. Funct. Mater. – 2010. – Vol. 20. – № 17. – P. 2833–2841.
92. Ma, P.X. Biomimetic materials for tissue engineering / P. X. Ma // Adv. Drug Deliv. Rev. – 2008. – Vol. 60. – № 2. – P. 184–198.
93. Mann, B.K. Tethered-TGF-β increases extracellular matrix production of vascular smooth muscle cells / B. K. Mann, R. H. Schmedlen, J. L. West // Biomaterials. – 2001. – Vol. 22. – № 5. – P. 439–444.
94. Mann, B.K. Smooth muscle cell growth in photopolymerized hydrogels with cell adhesive and proteolytically degradable domains: synthetic ECM analogs for tissue engineering / B. K. Mann, A. S. Gobin, A. T. Tsai, R. H. Schmedlen, J. L. West // Biomaterials. – 2001. – Vol. 22. – № 22. – P. 3045–3051.
95. Mathews, A. Vascular tissue construction on poly(ε-caprolactone) scaffolds by dynamic endothelial cell seeding: effect of pore size / A. Mathews, S. Colombus, V. K. Krishnan, L. K. Krishnan // J. Tissue Eng. Regen. Med. – 2012. – Vol. 6. – № 6. – P. 451–461.
96. McAllister T.N. Cell-based therapeutics from an economic perspective: Primed for a commercial success or a research sinkhole? / T. N. McAllister, N. Dusserre, M. Maruszewski, N. L'Heureux // Regen. Med. – 2008. – Vol. 3. – № 6. – P. 925–937.
97. McFetridge, P.S. Preparation of porcine carotid arteries for vascular tissue engineering

applications / P. S. McFetridge, J. W. Daniel, T. Bodamyali, M. Horrocks, J. B. Chaudhuri // J. Biomed. Mater. Res. A. – 2004. – Vol. 70A. – № 2. – P. 224–234.

98. McIntire, L.V. WTEC panel report on tissue engineering / L.V. McIntire // Tissue Eng. – 2003. – Vol. 9. – P. 3-7.

99. Mo, X.M. Electrospun P(LLA-CL) nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation / X. M. Mo, C. Y. Xu, M. Kotaki, S. Ramakrishna // Biomaterials. – 2004. – Vol. 25. – № 10. – P. 1883–1890.

100. Mohebbi-Kalhori, D. A novel automated cell-seeding device for tissue engineering of tubular scaffolds: design and functional validation / D. Mohebbi-Kalhori, M. Rukhlova, A. Ajji, M. Bureau, M. J. Moreno // J. Tissue Eng. Regen. Med. – 2012. – Vol. 6. – № 9. – P. 710–720.

101. Mooney, D.J. Stabilized polyglycolic acid fibre-based tubes for tissue engineering / D. J. Mooney, C. L. Mazzoni, C. Breuer, K. McNamara, D. Hern, J. P. Vacanti, R. Langer // Biomaterials. – 1996. – Vol. 17. – № 2. – P. 115–124.

102. Murase, Y. Evaluation of Compliance and Stiffness of Decellularized Tissues as Scaffolds for Tissue-Engineered Small Caliber Vascular Grafts Using Intravascular Ultrasound / Y. Murase, Y. Narita, H. Kagami, K. Miyamoto, Y. Ueda, M. Ueda, T. Murohara // ASAIO J. – 2006. – Vol. 52. – № 4. – P. 450–455.

103. Murphy, C.M. Understanding the effect of mean pore size on cell activity in collagen-glycosaminoglycan scaffolds / C. M. Murphy, F. J. O'Brien // Cell Adhes. Migr. – 2010. – Vol. 4. – № 3. – P. 377–381.

104. Naito, Y. Vascular tissue engineering: Towards the next generation vascular grafts / Y. Naito, T. Shinoka, D. Duncan, N. Hibino, D. Solomon, M. Cleary, A. Rathore, C. Fein, S. Church, C. Breuer // Adv. Drug Deliv. Rev. – 2011. – Vol. 63. – № 4–5. – P. 312–323.

105. Naito, Y. Tissue engineering in the vasculature / Y. Naito, K. Rocco, H. Kurobe, M. Maxfield, C. Breuer, T. Shinoka // Anat. Rec. (Hoboken). – 2014. – Vol. 297. – № 1. – P. 83–97.

106. Nasseri, B.A. Dynamic rotational seeding and cell culture system for vascular tube formation / B. A. Nasseri, I. Pomerantseva, M. R. Kaazempur-Mofrad, F. W. H. Sutherland, T. Perry, E. Ochoa, C. A. Thompson, J. E. Mayer Jr, S. N. Oesterle, J. P. Vacanti // Tissue Eng. – 2003. – Vol. 9. – № 2. – P. 291–299.

107. Nemeno-Guanzon, J.G. Trends in Tissue Engineering for Blood Vessels / J. G. Nemeno-Guanzon, S. Lee, J. R. Berg, Y. H. Jo, J. E. Yeo, B. M. Nam, Y.-G. Koh, J. I. Lee // J. Biomed. Biotechnol. – 2012. – Vol. 2012. – P. 1-14.

108. Nelson, G.N. Functional small-diameter human tissue-engineered arterial grafts in an immunodeficient mouse model: preliminary findings / G.N. Nelson, T. Mirensky, M. P. Brennan, J. D. Roh, T. Yi , Y. Wang Y, Breuer C.K. // Arch Surg. – 2008. – Vol. 143. - № 5. – P. 488–94.

109.Nerem, R.M. Vascular Tissue Engineering / R. M. Nerem, D. Seliktar // Annu. Rev. Biomed. Eng. – 2001. – Vol. 3. – № 1. – P. 225–243.

110.Nevelsteen, A. The human umbilical vein graft in below-knee femoropopliteal and femorotibial surgery: an eight year experience / A. Nevelsteen, M. A. D'Hallewin, J. Deleersnijder, L. Wouters, R. Suy // Ann. Vasc. Surg. – 1986. – Vol. 1. – № 3. – P. 328–334.

111.Ng, R. Centrifugal seeding of mammalian cells in nonwoven fibrous matrices / R. Ng, J. S. Gurm, S.-T. Yang // Biotechnol. Prog. – 2010. – Vol. 26. – № 1. – P. 239–245.

112.Nguyen, K.T. Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications / K. T. Nguyen, J. L. West // Biomaterials. – 2002. – Vol. 23. – № 22. – P. 4307–4314.

113.Nieponice, A. Vacuum rotational seeding and loading device and method for same / A. Nieponice, D. A. Vorp, L. Soletti // US patent 20060075963. – 2006.

114.Nieponice, A. Development of a tissue-engineered vascular graft combining a biodegradable scaffold, muscle-derived stem cells and a rotational vacuum seeding technique / A. Nieponice, L. Soletti, J. Guan, B. M. Deasy, J. Huard, W. R. Wagner, D. A. Vorp // Biomaterials. – 2008. – Vol. 29. – № 7. – P. 825–833.

115.Nieponice, A. *In Vivo* Assessment of a Tissue-Engineered Vascular Graft Combining a Biodegradable Elastomeric Scaffold and Muscle-Derived Stem Cells in a Rat Model / A. Nieponice, L. Soletti, J. Guan, Y. Hong, B. Gharaibeh, T. M. Maul, J. Huard, W. R. Wagner, D. A. Vorp // Tissue Eng. Part A. – 2010. – Vol. 16. – № 4. – P. 1215–1223.

116.Niklason, L.E. Functional arteries grown in vitro / L. E. Niklason, J. Gao, W. M. Abbott, K. K. Hirschi, S. Houser, R. Marini, R. Langer // Science. – 1999. – Vol. 284. – № 5413. – P. 489–493.

117.O'Brien, F.J. The effect of pore size on permeability and cell attachment in collagen scaffolds for tissue engineering / F. J. O'Brien, B. A. Harley, M. A. Waller, I. V. Yannas, L. J. Gibson, P. J. Prendergast // Technol. Health Care. – 2007. – Vol. 15. – № 1. – P. 3–17.

118.Ott, H.C. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart / H. C. Ott, T. S. Matthiesen, S.-K. Goh, L. D. Black, S. M. Kren, T. I. Netoff, D. A. Taylor // Nat. Med. – 2008. – Vol. 14. – № 2. – P. 213–221.

119.Parikh, S.A. Endothelial cell delivery for cardiovascular therapy / S. A. Parikh, E. R. Edelman // Adv. Drug Deliv. Rev. – 2000. – Vol. 42. – № 1-2. – P. 139–161.

120.Pawlowski, K.J. Endothelial cell seeding of polymeric vascular grafts / K. J. Pawlowski, S. E. Rittgers, S. P. Schmidt, G. L. Bowlin // Front. Biosci. – 2004. – Vol. 9. – P. 1412–1421.

121.Peck, M. The Evolution of Vascular Tissue Engineering and Current State of the Art / M. Peck, D. Gebhart, N. Dusserre, T. N. McAllister, N. L'Heureux // Cells Tissues Organs. – 2011. – Vol. 195. – № 1-2. – P. 144–158.

122.Pei, M. Bioreactors mediate the effectiveness of tissue engineering scaffolds / M. Pei, L. A.

Solchaga, J. Seidel, L. Zeng, G. Vunjak-Novakovic, A. I. Caplan, L. E. Freed // FASEB J. – 2002. – Vol. 16. – № 12. – P. 1691–1694.

123. Perea, H. Direct magnetic tubular cell seeding: a novel approach for vascular tissue engineering / H. Perea, J. Aigner, U. Hopfner, E. Wintermantel // Cells Tissues Organs. – 2006. – Vol. 183. – № 3. – P. 156–165.

124. Possati, G. Long-term results of the radial artery used for myocardial revascularization / G. Possati, M. Gaudino, F. Prati, F. Alessandrini, C. Trani, F. Glieca, M.A. Mazzari, N. Luciani, G. Schiavoni // Circulation. - 2003. –Vol. 108. - № 11. - P. 1350-1354.

125. Prichard, H.L. An early study on the mechanisms that allow tissue-engineered vascular grafts to resist intimal hyperplasia / H. L. Prichard, R. J. Manson, L. DiBernardo, L. E. Niklason, J. H. Lawson, S. L. M. Dahl // J Cardiovasc. Transl. Res. – 2011. – Vol. 4. – № 5. – P. 674–682.

126. Quint, C. Decellularized tissue-engineered blood vessel as an arterial conduit / C. Quint, Y. Kondo, R. J. Manson, J. H. Lawson, A. Dardik, L. E. Niklason // PNAS USA. – 2011. – Vol. 108. – № 22. – P. 9214–9219.

127. Ravi, S. Polymeric materials for tissue engineering of arterial substitutes / S. Ravi, Z. Qu, E. L. Chaikof // Vascular. – 2009. – Vol. 17 Suppl 1. – P. S45–54.

128. Resnick, N. Fluid shear stress and the vascular endothelium: for better and for worse / N. Resnick, H. Yahav, A. Shay-Salit, M. Shushy, S. Schubert, L. C. M. Zilberman, E. Wofovitz // Prog. Biophys. Mol. Biol. – 2003. – Vol. 81. – № 3. – P. 177–199.

129. Rieder, E. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells / E. Rieder, M.-T. Kasimir, G. Silberhumer, G. Seebacher, E. Wolner, P. Simon, G. Weigel // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. – 2004. – Vol. 127. – № 2. – P. 399–405.

130. Roh, J.D. Centrifugal seeding increases seeding efficiency and cellular distribution of bone marrow stromal cells in porous biodegradable scaffolds / J. D. Roh, G. N. Nelson, B. V. Udelsman, M. P. Brennan, B. Lockhart, P. M. Fong, R. I. Lopez-Soler, W. M. Saltzman, C. K. Breuer // Tissue Eng. – 2007. – Vol. 13. – № 11. – P. 2743–2749.

131. Rondhuis, J.J. The use of autologous graft and human umbilical vein graft in femorocrural bypasses - a preliminary report / J. J. Rondhuis, J. G. van Iersel, A. C. Taks // Neth. J. Surg. – 1985. – Vol. 37. – № 2. – P. 50–53.

132. Roy, S. Biomechanical properties of decellularized porcine common carotid arteries / S. Roy, P. Silacci, N. Stergiopulos // Am. J. Physiol. – 2005. – Vol. 289. – № 4. – P. H1567–1576.

133. Sadaba, J.R. Effect of radial artery harvesting on tissue perfusion and function of the hand. Original Research Article / J.R. Sadaba, J.L. Conroy, M. Burniston, J. Maughan, C. Munsch // Cardiovascular Surgery. – 2001. – Vol. 9. - № 4. - P. 378-382.

134.Sagnella, S. Human endothelial cell interaction with biomimetic surfactant polymers containing Peptide ligands from the heparin binding domain of fibronectin / S. Sagnella, E. Anderson, N. Sanabria, R. E. Marchant, K. Kottke-Marchant // Tissue Eng. – 2005. – Vol. 11. – № 1-2. – P. 226–236.

135.Salacinski, H.J. Cellular engineering of vascular bypass grafts: role of chemical coatings for enhancing endothelial cell attachment / H. J. Salacinski, A. Tiwari, G. Hamilton, A. M. Seifalian // Med. Biol. Eng. Comput. – 2001. – Vol. 39. – № 6. – P. 609–618.

136.Sapsford, R.N. Early and late patency of expanded polytetrafluoroethylene vascular grafts in aorta-coronary bypass / R. N. Sapsford, G. D. Oakley, S. Talbot // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. – 1981. – Vol. 81. – № 6. – P. 860–864.

137.Schaner, P.J. Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering / P. J. Schaner, N. D. Martin, T. N. Tulenko, I. M. Shapiro, N. A. Tarola, R. F. Leichter, R. A. Carabasi, P. J. DiMuzio // J. Vasc. Surg. – 2004. – Vol. 40. – № 1. – P. 146–153.

138.Schmedlen, R.H. Tissue engineered small-diameter vascular grafts / R. H. Schmedlen, W. M. Elbjeirami, A. S. Gobin, J. L. West // Clin. Plast. Surg. – 2003. – Vol. 30. – № 4. – P. 507–517.

139.Schmidt, C.E. Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering / C. E. Schmidt, J. M. Baier // Biomaterials. – 2000. – Vol. 21. – № 22. – P. 2215–2231.

140.Seib, F.P. Multifunctional silk-heparin biomaterials for vascular tissue engineering applications / F. P. Seib, M. Herklotz, K. A. Burke, M. F. Maitz, C. Werner, D. L. Kaplan // Biomaterials. – 2014. – Vol. 35. – № 1. – P. 83–91.

141.Seifu, D.G. Small-diameter vascular tissue engineering / D. G. Seifu, A. Purnama, K. Mequanint, D. Mantovani // Nat. Rev. Cardiol. – 2013. – Vol. 10. – № 7. – P. 410–421.

142.Shachar, M. Cardiac tissue engineering, ex-vivo: design principles in biomaterials and bioreactors / M. Shachar, S. Cohen // Heart Failure Rev. – 2003. – Vol. 8. - № 3. – P. 271-276.

143.Shah, S.A. Retrospective Analysis of Local Sensorimotor Deficits After Radial Artery Harvesting for Coronary Artery Bypass Grafting . Original Research Article / S.A. Shah, D. Chark, J. Williams, A. Hessheimer, J. Huh, Y.-C. Wu, P.A. Chang, F.G. Scholl, D.C. Drinkwater //J. of Surg. Research. – 2007. – Vol. 139. - № 2. – P. 203-208.

144.Shimizu, K. Effective cell-seeding technique using magnetite nanoparticles and magnetic force onto decellularized blood vessels for vascular tissue engineering / K. Shimizu, A. Ito, M. Arinobe, Y. Murase, Y. Iwata, Y. Narita, H. Kagami, M. Ueda, H. Honda // J. Biosci. Bioeng. – 2007. – Vol. 103. – № 5. – P. 472–478.

145.Shin'oka, T. Midterm clinical result of tissue-engineered vascular autografts seeded with autologous bone marrow cells / T. Shin'oka, G. Matsumura, N. Hibino, Y. Naito, M. Watanabe, T.

Konuma, T. Sakamoto, M. Nagatsu, H. Kurosawa // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. – 2005. – Vol. 129. – № 6. – P. 1330–1338.

146. Shum-Tim, D. Tissue engineering of autologous aorta using a new biodegradable polymer / D. Shum-Tim, U. Stock, J. Hrkach, T. Shinoka, J. Lien, M. A. Moses, A. Stamp, G. Taylor, A. M. Moran, W. Landis, R. Langer, J. P. Vacanti, J. E. Mayer Jr // Ann. Thorac. Surg. – 1999. – Vol. 68. – № 6. – P. 2298–2304.

147. Smith, A.N. Characterization and implementation of a decellularized porcine vessel as a biologic scaffold for a blood vessel mimic : Masters Thesis / Aubrey Nichole Smith. - San Luis: California Polytechnic State Univ, 2011. - 196 p.

148. Sobral, J.M. Three-dimensional plotted scaffolds with controlled pore size gradients: Effect of scaffold geometry on mechanical performance and cell seeding efficiency / J. M. Sobral, S. G. Caridade, R. A. Sousa, J. F. Mano, R. L. Reis // Acta Biomater. – 2011. – Vol. 7. – № 3. – P. 1009–1018.

149. Sodian, R. Tissue-engineering bioreactors: a new combined cell-seeding and perfusion system for vascular tissue engineering / R. Sodian, T. Lemke, C. Fritsche, S. P. Hoerstrup, P. Fu, E. V. Potapov, H. Hausmann, R. Hetzer // Tissue Eng. – 2002. – Vol. 8. – № 5. – P. 863–870.

150. Solchaga, L.A. A Rapid Seeding Technique for the Assembly of Large Cell/Scaffold Composite Constructs / L. A. Solchaga, E. Tognana, K. Penick, H. Baskaran, V. M. Goldberg, A. I. Caplan, J. F. Welter // Tissue Eng. – 2006. – Vol. 12. – № 7. – P. 1851–1863.

151. Soletti, L. A seeding device for tissue engineered tubular structures / L. Soletti, A. Nieponice, J. Guan, J. J. Stankus, W. R. Wagner, D. A. Vorp // Biomaterials. – 2006. – Vol. 27. – № 28. – P. 4863–4870.

152. Soletti, L. A Bi-Layered Elastomeric Scaffold for Tissue Engineering of Small-Diameter Vascular Grafts / L. Soletti, Y. Hong, J. Guan, J. J. Stankus, M. S. El-Kurdi, W. R. Wagner, D. A. Vorp // Acta Biomater. – 2010. – Vol. 6. – № 1. – P. 110–122.

153. Stegemann, J.P. Review: advances in vascular tissue engineering using protein-based biomaterials / J. P. Stegemann, S. N. Kaszuba, S. L. Rowe // Tissue Eng. – 2007. – Vol. 13. – № 11. – P. 2601–2613.

154. Stephan, S. Cell-matrix biology in vascular tissue engineering / S. Stephan, S. G. Ball, M. Williamson, D. V. Bax, A. Lomas, C. A. Shuttleworth, C. M. Kielty // J. Anat. – 2006. – Vol. 209. – № 4. – P. 495–502.

155. Teebken, O.E. Tissue Engineering of Vascular Grafts: Human Cell Seeding of Decellularised Porcine Matrix / O. E. Teebken, A. Bader, G. Steinhoff, A. Haverich // Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. – 2000. – Vol. 19. – № 4. – P. 381–386.

156. Teebken, O.E. Tissue Engineering of Small Diameter Vascular Grafts / O. E. Teebken, A.

Haverich // Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. – 2002. – Vol. 23. – № 6. – P. 475–485.

157. Thomas, A.C. Advances in vascular tissue engineering / A. C. Thomas, G. R. Campbell, J. H. Campbell // Cardiovasc. Pathol. – 2003. – Vol. 12. – № 5. – P. 271–276.

158. Thomson, G.J.L. Cell Seeding for Small Diameter ePTFE Vascular Grafts: A Comparison Between Adult Human Endothelial and Mesothelial Cells / G. J. L. Thomson, R. Vohra, M. G. Walker // Ann. Vasc. Surg. – 1989. – Vol. 3. – № 2. – P. 140–145.

159. Tiwari, A. Magnetic beads (Dynabead) toxicity to endothelial cells at high bead concentration: implication for tissue engineering of vascular prosthesis / A. Tiwari, G. Punshon, A. Kidane, G. Hamilton, A. M. Seifalian // Cell Biol. Toxicol. – 2003. – Vol. 19. – № 5. – P. 265–272.

160. Topper, J.N. Blood flow and vascular gene expression: fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype / J. N. Topper, M. A. Gimbrone Jr // Mol. Med. Today. – 1999. – Vol. 5. – № 1. – P. 40–46.

161. Udelsman, B. Development of an Operator-Independent Method for Seeding Tissue-Engineered Vascular Grafts / B. Udelsman, N. Hibino, G. A. Villalona, E. McGillicuddy, A. Nieponice, Y. Sakamoto, S. Matsuda, D. A. Vorp, T. Shinoka, C. K. Breuer // Tissue Eng. Part C Methods. – 2011. – Vol. 17. – № 7. – P. 731–736.

162. Veith, F.J. Six-year prospective multicenter randomized comparison of autologous saphenous vein and expanded polytetrafluoroethylene grafts in infrainguinal arterial reconstructions / F. J. Veith, S. K. Gupta, E. Ascer, S. White-Flores, R. H. Samson, L. A. Scher, J. B. Towne, V. M. Bernhard, P. Bonier, W. R. Flinn // J. Vasc. Surg. – 1986. – Vol. 3. – № 1. – P. 104–114.

163. Villalona, G.A. Cell-Seeding Techniques in Vascular Tissue Engineering / G. A. Villalona, B. Udelsman, D. R. Duncan, E. McGillicuddy, R. F. Sawh-Martinez, N. Hibino, C. Painter, T. Mirensky, B. Erickson, T. Shinoka, C. K. Breuer // Tissue Eng. Part B Rev. – 2010. – Vol. 16. – № 3. – P. 341–350.

164. Vunjak-Novakovic, G. Dynamic cell seeding of polymer scaffolds for cartilage tissue engineering / G. Vunjak-Novakovic, B. Obradovic, I. Martin, P. M. Bursac, R. Langer, L. E. Freed // Biotechnol. Prog. – 1998. – Vol. 14. – № 2. – P. 193–202.

165. Wachem, P.B. van Vacuum cell seeding: a new method for the fast application of an evenly distributed cell layer on porous vascular grafts / P. B. van Wachem, J. W. Stronck, R. Koers-Zuideveld, F. Dijk, C. R. Wildevuur // Biomaterials. – 1990. – Vol. 11. – № 8. – P. 602–606.

166. Wake, M.C. Fabrication of pliable biodegradable polymer foams to engineer soft tissues / M. C. Wake, P. K. Gupta, A. G. Mikos // Cell Transplant. – 1996. – Vol. 5. – № 4. – P. 465–473.

167. Wang, S. Fabrication of small-diameter vascular scaffolds by heparin-bonded P(LLA-CL) composite nanofibers to improve graft patency / S. Wang, X. M. Mo, B. J. Jiang, C. J. Gao, H. S. Wang, Y. G. Zhuang, L. J. Qiu // Int. J. Nanomedicine. – 2013. – Vol. 8. – P. 2131–2139.

168. Wang, X. Intelligent freeform manufacturing of complex organs / X. Wang // Artif Organs. - 2012. – Vol. 36. – P. 951-961.

169. Watanabe, M. Tissue-Engineered Vascular Autograft: Inferior Vena Cava Replacement in a Dog Model / M. Watanabe, T. Shin'oka, S. Tohyama, N. Hibino, T. Konuma, G. Matsumura, Y. Kosaka, T. Ishida, Y. Imai, M. Yamakawa, Y. Ikada, S. Morita // Tissue Eng. – 2001. – Vol. 7. – № 4. – P. 429–439.

170. Way, L. Cytocentrifugation: a convenient and efficient method for seeding tendon-derived cells into monolayer cultures or 3-D tissue engineering scaffolds / L. Way, N. Scutt, A. Scutt // Cytotechnology. – 2011. – Vol. 63. – № 6. – P. 567–579.

171. Weinberg, C.B. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells / C. B. Weinberg, E. Bell // Science. – 1986. – Vol. 231. – № 4736. – P. 397–400.

172. West, J.L. Modification of materials with bioactive peptides / J. L. West // Methods Mol. Biol. Clifton NJ. – 2004. – Vol. 238. – P. 113–122.

173. Williams, C. Perfusion bioreactor for small diameter tissue-engineered arteries / C. Williams, T. M. Wick // Tissue Eng. – 2004. – Vol. 10. – № 5-6. – P. 930–941.

174. Williams, C. Altered structural and mechanical properties in decellularized rabbit carotid arteries / C. Williams, J. Liao, E. M. Joyce, B. Wang, J. B. Leach, M. S. Sacks, J. Y. Wong // Acta Biomater. – 2009. – Vol. 5. – № 4. – P. 993–1005.

175. Wolf, M. Seeding Implantable Medical Devices with Cells / M. Wolf, L. Yunker, P. Trescony. - US patent WO/2006/094146. – 2006.

176. World health statistics 2013 / World Health Organization. - Geneva : WHO Press, 2013. – 176 p.

177. Wray, L.S. Slowly degradable porous silk microfabricated scaffolds for vascularized tissue formation / L. S. Wray, K. Tsioris, E. S. Gi, F. G. Omenetto, D. L. Kaplan // Adv. Funct. Mater. – 2013. – Vol. 23. – № 27. – P. 3404–3412.

178. Xu, C. Electrospun nanofiber fabrication as synthetic extracellular matrix and its potential for vascular tissue engineering / C. Xu, R. Inai, M. Kotaki, S. Ramakrishna // Tissue Eng. – 2004. – Vol. 10. – № 7-8. – P. 1160–1168.

179. Yasuda, K. Influence of Culture Method on the Proliferation and Osteogenic Differentiation of Human Adipo-stromal Cells in Nonwoven Fabrics / K. Yasuda, S. Inoue, Y. Tabata // Tissue Eng. – 2004. – Vol. 10. – № 9-10. – P. 1587–1596.

180. Yeh, H.S. Human umbilical artery for microvascular grafting. Experimental study in the rat / H. S. Yeh, J. T. Keller, K. A. Brackett, E. Frank, J. M. Tew Jr // J. Neurosurg. – 1984. – Vol. 61. – № 4. – P. 737–742.

181. Yow, K.-H. Tissue engineering of vascular conduits / K.-H. Yow, J. Ingram, S. A. Korossis, E. Ingham, S. Homer-Vanniasinkam // Br. J. Surg. – 2006. – Vol. 93. – № 6. – P. 652–661.

182. Zhao, Y. The development of a tissue-engineered artery using decellularized scaffold and autologous ovine mesenchymal stem cells / Y. Zhao, S. Zhang, J. Zhou, J. Wang, M. Zhen, Y. Liu, J. Chen, Z. Qi // Biomaterials. – 2010. – Vol. 31. – № 2. – P. 296–307.
183. Zou, Y. Mechanical Evaluation of Decellularized Porcine Thoracic Aorta / Y. Zou, Y. Zhang // J. Surg. Res. – 2012. – Vol. 175. – № 2. – P. 359–368.
184. Zünd, G. Tissue engineering: A new approach in cardiovascular surgery; Seeding of human fibroblasts followed by human endothelial cells on resorbable mesh / G. Zünd, S. P. Hoerstrup, A. Schoeberlein, M. Lachat, G. Uhlschmid, P. R. Vogt, M. Turina // Eur. J. Cardiothorac. Surg. – 1998. – Vol. 13. – № 2. – P. 160–164.